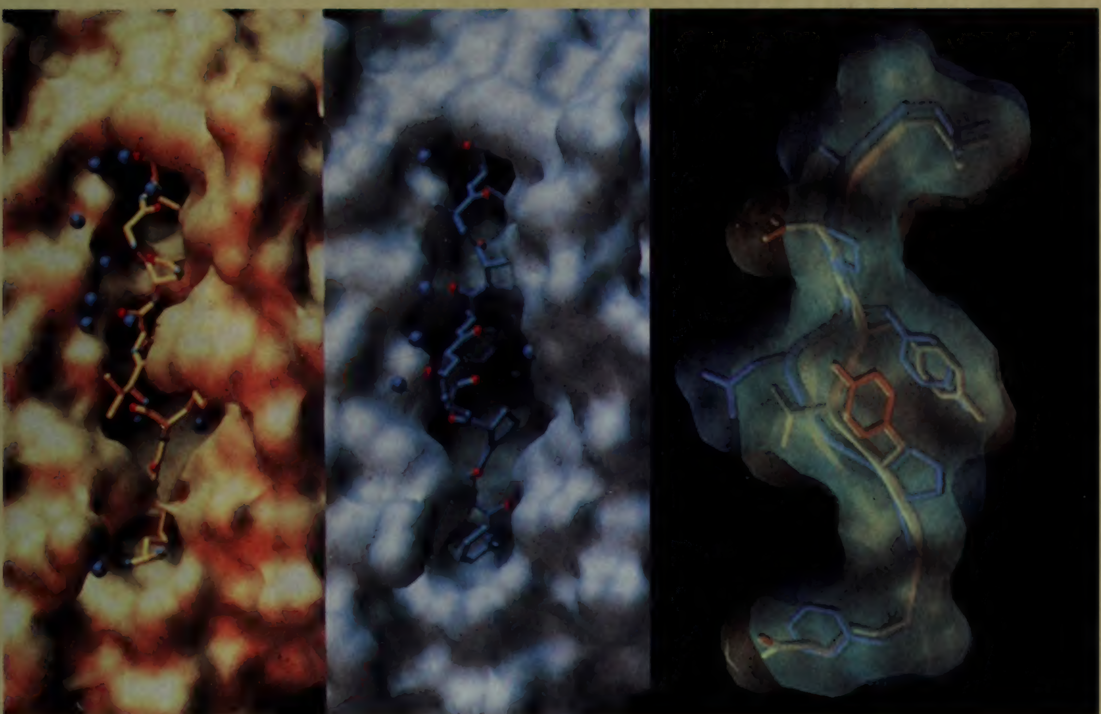
现代生物技术译丛

蛋白质结构分析：制备、鉴定与微量测序

Protein Structure Analysis:
Preparation, Characterization and Microsequencing



〔德〕R. M. 坎普
B. 威特曼-利伯德
〔希腊〕T. 乔里-帕帕多普洛

科学出版社

Digitized by the Internet Archive
in 2011 with funding from
Institute of Botany, CAS and Internet Archive

http://www.archive.org/details/danbaizhijiegouf00rmka

中科院植物所图书馆
S0003873

58.17421
255

现代生物技术译丛

蛋白质结构分析：制备、鉴定与微量测序

〔德〕R.M.坎普
B.威特曼-利伯德　〔希腊〕T.乔里-帕帕多普洛　编著

施蕴渝　饶子和　陈常庆　等译

科学出版社

2001

内 容 简 介

结构生物学是生命科学领域又一个新的研究热点，飞速发展的蛋白质结构分析技术是研究蛋白质功能的基础。随着蛋白质组时代的来临，许多基因组分析留下的悬而未决的问题，可能通过直接的蛋白质的分离和鉴定而得到解决。本书涉及了这个领域最新、最灵敏的方法。这些方法和技术广泛应用于当今从事制药、生物医药和蛋白质测序的生化和生物工程实验室。本书由20位有经验的科学家编撰而成，内容包括蛋白质和多肽的分离、人工和自动微量测序、氨基酸组成分析、二硫键和脂类的确定、电泳和印迹技术、生物大分子的质谱光谱测定和结晶等各个环节的原理、材料、方法和操作步骤。每个实验步骤详尽，而且都经过了实际操作的验证，参考价值和可重复性非常强。

本书也可供有志于从事自然科学研究的学者参考。

R. M. Kamp，T. Choli-Papadopoulou，B. Wittmann-Liebold
Protein Structure Analysis：Preparation，Characterization and Microsequencing
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg，1997

图字 01－98－2298

图书在版编目（CIP）数据

蛋白质结构分析：制备、鉴定与微量测序/〔德〕坎普（Kamp，R. M.），〔希腊〕T. 乔里-帕帕多普洛（T. Choli-Papadopoulou）等编著；施蕴渝等译.-北京:科学出版社,2000.3
(现代生物技术译丛)

ISBN 7－03－007648－6

Ⅰ.蛋… Ⅱ.①坎… ②施… Ⅲ.①蛋白质-结构分析 ②蛋白质-化学加工 Ⅳ.TQ937

中国版本图书馆 CIP 数据核字（1999）第 23997 号

科学出版社 出版
北京东黄城根北街 16 号
邮政编码:100717
北京双青印刷厂 印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销
*
2000 年 3 月第 一 版 开本:787×1092 1/16
2001 年 5 月第二次印刷 印张:14 1/2
印数:3 001—5 000 字数:328 000

定价:40.00 元

（如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉）

前言

《蛋白质结构分析：制备、鉴定与微量测序》乃是一部蛋白质和多肽结构分析的实践方法汇编。本书中，大约有20个作者对灵敏的蛋白质纯化与分析技术作了说明和评述。这些方法正在用于全世界各个药物和生物医学实验室或蛋白质测序单位的生化和生物医学研究中。书中各章都是由在这些领域中具有丰富经验的科学家所写，实验部分则已很好地记录、整理，因此读者们应该能够很容易地重复这些实验。本书中收录的这些方法曾经在大学课程和1995年9月10～15日EMBO在柏林举办的"蛋白质微量测序"训练班上作过演示。题目也来自于1995年4月在希腊Halkidiki和Thessaloniki召开的FEBS研讨会，多数作者在这些课程中都曾经是讲课人和指导者，使得这些课非常有生气和成功。各种多肽因它们的结构和功能的不同而有很大的差异，因而结构分析的策略必须是对于每一个具体蛋白质能大部分适用。书中对于实验方法成功和局限之处的讨论也是很关注的，从而使读者能够对于可能将会遇到的问题有所熟悉。

新加入到蛋白质化学领域来的青年科学家们可能会问：为什么需要再学习所有那些关于纯化和鉴定各个具体蛋白质和肽的既具有技巧性而又繁琐的操作过程呢？蛋白质基因的克隆与测序是推导出氨基酸链的最常用的一个现代化方法，因而可能并不需要直接去研究蛋白质。我们经常会听到这样一种说法：即采用分子生物学技术，我们可以做到所有这一切。可是，最近关于酵母和人类基因组项目的研究结果以及随后许多具有未知生物学功能的内含子和外显子序列的发现，使得人们不得不去探索和研究蛋白质本身。再者，10～15年前从蛋白质研究到基因分析的这个转移，留下了许多悬而未决的问题，它们可能通过直接的蛋白质分离和鉴定而得到解决。我们强烈地劝告有志于自然科学研究的青年科学家们尽可能多学习一些蛋白质和多肽的结构分析技术，从而使得在他们研究中所碰到的问题能够通过研究所涉及的蛋白质而得到解决。

我们打算提供一个常用的蛋白质分析技术，但不可能包罗当前所用的全部。蛋白质和多肽结构的差异性是非常之大，从仅有几个氨基酸组成的很小的多肽链到超过一千个氨基酸残基以上组成的大蛋白，从非常亲水性的球状结构到可以伸展的具有高度疏水性的膜蛋白。一个单细胞含有几千个不同的蛋白质和多肽。实际上，人体中多肽的生物量大约占17%，这些生物高分子参与了活细胞的所有基本过程，如在体液中的运输和分子的跨膜转运、信号转导、基因信息的转录和在核糖体上翻译成氨基酸序列、免疫应答的介导、蛋白质（酶）和肽（激素）在生物合成路线中的控制与调节等。至于蛋白质和多肽的结构与功能关系在从分子水平上了解生物学机制中的极其重要性那就更不用说了。

蛋白质具有复杂的结构，线性的多肽链以一定的方式形成三维的折叠，折叠方式对每种蛋白质来说是特异的、并且是单一的。这种特异性全部蕴藏在其氨基酸序列之中。

但一个线性的结构如何折叠成为高级结构在生物化学中尚是一个谜。第一，必须确定一级结构（氨基酸序列）；第二，必须找出与线性结构相关的二级结构单元（α-螺旋、β-片层、伸展结构、转折或卷曲）；第三，必须研究蛋白质如何折叠成为更高级的结构（三级结构）；最后，测定与其他的多肽链或其他分子间的相互作用（四级结构）。蛋白质晶体的 X-射线结构分析和蛋白质在溶液中的 NMR 研究，是测定蛋白质三级结构的强有力的工具，但要正确地解释这些结果的基础肯定还得靠氨基酸序列的知识。任何一类修饰，如磷酰化、甲基化或乙酰化，都是会增加蛋白质的特征或者改变它的性质。此外，许多蛋白质还是由各种蛋白质与 RNA 或 DNA 所组成的复合物中的一个组分，它们可能与脂或糖等连接，因此，知道氨基酸序列和三级结构，并且确定氨基酸的修饰和 S-S 键的存在虽然是很重要的，但还需要搞清是否还有配体、辅助因子和（或）其他分子与所研究的蛋白质组成复合物。最后，还必须说明形成稳定的具有全部活性的复合物的结合部位和结合力，这就是为什么测定蛋白质的结构并从分子水平上说明它的功能作用并不简单的原因所在，必须采用许多复杂的方法来研究蛋白质在生物过程中的作用。

蛋白质研究包括了物理的、物理化学的、化学的和生物学的方法。虽然在这里不可能对所有的方法都进行介绍，但我们希望我们已经收集了合适的对于初学者易于掌握的现代灵敏技术，它将会促进蛋白质的结构与功能研究。所列举的方法都相当成熟，并经有经验的研究者证明是有用的。本书包括了对结构与功能研究在天然和变性条件下的纯化方法，介绍了用单向和双向聚丙烯酰胺凝胶对复杂的蛋白质混合物进行制备与分离的微量方法，以及高灵敏的氨基酸组成分析技术和手动与自动测序技术。此外，还介绍了数据库搜索的方法，它可以将许多蛋白质的两个序列或多个联配体（multi-alignment）进行联配。从而可以通过由 Edman 降解法得到的 N 末端和中部的部分序列来确定蛋白质。MALDI-质谱仪已经成为用质谱分析方法鉴定蛋白质和肽段的一种高度灵敏的快速分析手段，为本书介绍的蛋白质鉴定方法增添了色彩。

读者如果有什么问题，本书的作者和编者们将很乐意根据读者请求给予帮助和协助。

1996 年 9 月于柏林

ROZA MARIA KAMP
THEODORA CHOLI-PAPADOPOULOU
BRIGITTE WITTMANN-LIEBOLD

参与编写成员表

THEODORA CHOLI-PAPADOPOULOU
Aristotle University
of Thessaloniki
School of Chemistry
Laboratory of Biochemistry
54006 Thessaloniki, Greece

TSEZI EGOROV
Engelhardt Institute
of Molecular Biology
Analytical Protein Chemistry
Research Unit
ul. Vavilova
32, Moscow 117984
Russian Federation

FRANÇOIS FRANCESCHI
Max-Planck Institut
für molekulare, Genetik
Ihnestraße 73
14195 Berlin, Germany

THOMAS G. GIANNAKOUROS
Laboratory of Biochemistry
School of Chemistry
Aristotle University
of Thessaloniki
Thessaloniki 54006, Greece

FRANZ GODT
Technische Fachhochschule
Berlin, FB3
(Chemie und Biotechnik)
Seestraße 64
13347 Berlin, Germany

KATERINA KATSANI
Aristotle University
of Thessaloniki
School of Chemistry
Seestraße 64
13347 Berlin, Germany

ULF HELLMAN
Ludwig Institute for Cancer
Research, Box 595
75124 Uppsala, Sweden

HISASHI HIRANO
Yokohoma City University
Kihara Institute
for Biological Research
Majoka-cho 641–12
Totsuka-ku, Yokohama 244
Japan

LOTHAR JACOB
E. Merck
Abt. Bio- und
Produktionschromatographie
64271 Darmstadt, Germany

PETER JUNGBLUT
Max-Planck Institut
für Infektionsbiologie, AG
Proteinanalytik
Monbijoustraße 2
10117 Berlin, Germany

ROZA MARIA KAMP
Technische Fachhochschule
Berlin, FB3
(Chemie und Biotechnik)

YANNIS SKENDROS
Aristotle University
of Thessaloniki
School of Chemistry
Laboratory of Biochemistry
54006 Thessaloniki, Greece

Laboratory of Biochemistry
54006 Thessaloniki, Greece

REGINE KRAFT
Max-Delbrück-Centrum
für Molekulare Medizin
(MDC)
Robert-Rössle-Straße 10
13122 Berlin, Germany

KERSTIN KRAUSE
Technische Fachhochschule
Berlin, FB3
(Chemie und Biotechnik)
Seestrasse 64
13347 Berlin, Germany

D.A. KYRIAKIDIS
Aristotle University
of Thessaloniki
School of Chemistry
Laboratory of Biochemistry
54006 Thessaloniki, Greece

JOHANN SALNIKOW
Technische Universität Berlin
Institut für Biochemie
und Molekulare Biologie
Franklinstraße 29
10587 Berlin, Germany

HORST SCHÜTTE
Technische Fachhochschule
Berlin, FB3
(Chemie und Biotechnik)
Seestraße 64
13347 Berlin, Germany

ALBRECHT OTTO
Max-Delbrück-Centrum
für Molekulare Medizin
(MDC)
Robert-Rössle-Straße 10
13122 Berlin, Germany

BERND THIEDE
MDC Forschungsgruppe
Proteinchemie
Max-Delbrück-Centrum
für Molekulare Medizin
Robert-Rössle-Straße 10
13125 Berlin-Buch, Germany

DIRK VOLLENBROICH
Technische Universität Berlin
Institut für Biochemie
und Molekular Biologie
Franklinstraße 29
10587 Berlin, Germany

B. WITTMANN-LIEBOLD
Max-Delbrück-Centrum
für Molekulare Medizin
Research Group Protein
Chemistry
Robert-Rössle-Straße 10
13125 Berlin-Buch, Germany

HELMUT WOMBACHER
Technische Fachhochschule
Berlin, FB3
(Chemie und Biotechnik)
Studiengang Biotechnologie
Seestraße 64
13347 Berlin, Germany

目　录

前言
参与编写成员表
第一部分　蛋白质的分离 …… (1)
第 1 章　测序用蛋白质的纯化 …… (3)
第 2 章　蛋白质的亲和层析 …… (8)
第 3 章　双向水溶液系统的蛋白质纯化 …… (23)
第 4 章　采用非孔状硅胶珠填充的短柱作蛋白质、多肽和氨基酸的快速 HPLC 分离 …… (33)
第二部分　多肽的分离 …… (41)
第 5 章　蛋白质的酶学和化学降解 …… (43)
第 6 章　肽的 HPLC 分离和薄层层析（TLC）指纹图 …… (50)
第 7 章　原位降解肽的微量分离 …… (57)
第 8 章　采用胶内蛋白酶降解的微量测序用的肽的分离 …… (66)
第三部分　手工和自动微量测序 …… (73)
第 9 章　自动微量测序：引言与概述 …… (75)
第 10 章　DABITC/PITC 法手工测定蛋白质序列 …… (94)
第 11 章　肽和蛋白质的固相测序 …… (105)
第 12 章　从聚丙烯酰胺凝胶固定到 PVDF 膜上的 N 端封闭蛋白质的序列分析 …… (113)
第四部分　蛋白质的电泳和印迹 …… (123)
第 13 章　双向电泳 …… (125)
第 14 章　疏水膜的半干式印迹法 …… (148)
第五部分　氨基酸的分析 …… (159)
第 15 章　高灵敏度氨基酸分析 …… (161)
第 16 章　用 HPLC 进行 D-和 L-氨基酸定量分析 …… (174)
第六部分　蛋白质中的半胱氨酸残基和脂类的鉴别 …… (181)
第 17 章　蛋白质中半胱氨酸残基与二硫键的鉴别 …… (183)
第 18 章　蛋白的脂类修饰 …… (190)
第七部分　质谱在肽及蛋白质分析中的应用 …… (197)
第 19 章　质谱在肽及蛋白质测序中的应用 …… (199)
第 20 章　羧肽 Y 和 P 酶水解与基质辅助的激光解吸/电离质谱相结合的羧端测序 …… (210)
第 21 章　生物大分子的结晶 …… (216)

第一部分
蛋白质的分离

第1章

测序用蛋白质的纯化

D. A. Kyriakidis

1.1 引　言

在过去的10年中，蛋白质纯化的生物化学方法已经变得如此专门化和复杂化，以至对于一些初学者，如刚从大学毕业的学生或者其他领域的专家们来说，要掌握所有的微小地方和重要细节而取得成功的纯化是困难的。应当经常记住，为了纯化某一特定的蛋白质，可以有多种不同的方法，如果一种方法行不通，可以尝试另一种方法。

我将不打算讨论在这一领域中的所有的最新进展，因为已有人在其他地方对此作过很好的论述（Harris and Angal 1989，1990；Scopes 1994），但对蛋白质纯化的一些基本准则将会提到，蛋白质纯化的某些最近的进展也会被讨论。

1.2 蛋白质纯化的准则

为了成功纯化一个蛋白质，需要有一个根据背景知识和下述准则建立起来的合适的策略（Harris and Angal 1989）：

• 什么是最好的来源？

一般来说，值得在找寻蛋白质丰富来源方面花一些时间，对于来源的是否方便得到和来源的量都必须考虑。过去，在实验室中经常是从牛肝、鼠肝或者其他动物的肝脏中得到大量的蛋白质。现在，大多数生化学家则是采用培养的细胞如细菌、酵母或哺乳动物细胞。目前，利用基因克隆的长处，所需要的蛋白质可以通过表达来大量得到，从而使得纯化方法更具有意义。

• 关于蛋白质我们已知什么？

如果一个蛋白质过去已经从不同的来源纯化得到，它的很多信息可以应用到新来源的蛋白质。例如：分子的大小、定位、等电点、疏水性及翻译后的修饰等，应该保持相同。如果蛋白质是一个酶或受体，则根据该蛋白质与底物或配体的关系可以制定出一个成功的纯化策略。

• 蛋白质需要有多纯？

蛋白质纯化的程度通常是取决于它最后的用途。如果蛋白质是供研究用的，则它

应该是非常纯的，如果蛋白质是用于工业的，部分纯化就足够了。

- 纯化蛋白的量要多少?

对于活性研究用的，只需要比较少量的活性蛋白质，而对于进行结构研究用的蛋白质来说，则需要比较大量的高纯度蛋白质。

- 蛋白质应该如何进行鉴定?

在蛋白质纯化过程中，为了进行蛋白质的追踪，必须有一个快速、重复性好而且灵敏的鉴定方法。此鉴定方法还应该是经济的，能在小体积下进行操作，而且不要求采用昂贵的仪器。

- 纯化时间应该多长?

纯化步骤应该很快，以减少活力的丧失和降解等。一般来说，蛋白质的量在纯化过程的各步中会有损失，因此应当尽量减少纯化步骤，以期获得最大的产率。

- 什么是最终花费?

对于商用蛋白质来说费用和时间非常重要。

- 如何纯化蛋白质?

为了纯化某一种蛋白质，可以有多种方法。老的方法包括用盐使蛋白质沉淀、改变抽提液的 pH、吸附、阴离子交换和凝胶过滤等技术；新方法包括有 HPLC 和 FPLC 柱、亲和吸附、免疫亲和柱以及已有综述谈到的许多其他的技术（Harris and Angal 1989，1990；Scopes 1994)。这些新的技术使得许多很难于纯化的蛋白质都能被纯化。因此在任何一个纯化开始之前，所有上述的问题都应该给以充分的考虑。

1.3 重组蛋白质的纯化

转化细胞中的蛋白质纯化近来已变得时髦起来，几乎与从天然来源中的蛋白质纯化同样普遍（Harris and Angal 1990；Scopes 1994)。前一种方法包括有许多步骤，但最需要考虑的关键点有：

1）特定基因的分离

2）所需要蛋白的高表达（高拷贝质粒、强启动子和诱导表达）

3）从重组细胞中进行纯化的方法是否适用

在细菌宿主细胞中表达的重组蛋白一般可能是胞外蛋白、膜结合蛋白、胞内蛋白或者是包涵体形式（Harris and Angal 1990；Scopes 1994)。重组蛋白的纯化有许多优点，因为它有可能改变蛋白质在起始抽提液中的水平。而且分离除去杂蛋白的技术也与传统纯化方法中所用的基本相同。

不幸的是，所得到的重组蛋白一般不是得到活性的形式（Schein 1989)。高表达的真核和原核的不溶蛋白，即包涵体，像 6mol/L 尿素或 8mol/L 盐酸胍等这类强的离液剂

所溶解，然后在除去变性剂的过程中或过程之后实现正确的折叠（Marston 1986；Marston et al. 1988）。人们也可能通过直接加入亲和树脂来纯化包涵体蛋白而不需要变性和复性的步骤（Hoess et al. 1988）。包涵体蛋白纯化时所碰到的问题有：①变性剂（尿素或胍）使用起来不太令人喜欢，而且价钱较贵。它们能够引起蛋白质结构的不可逆修饰，从而导致给除了免疫系统以外的所有其他分析数据带来一些假象。② 必须在很稀的蛋白质浓度条件进行复性，因而蛋白质需要再浓缩（Marston 1986；van Kimmenade et al. 1988），而重浓缩这一步会由于蛋白酶的降解而导致复杂化并发生蛋白质的进一步沉淀。③ 重折叠复性会导致引起蛋白质的异构化，并造成蛋白质在保存时产生沉淀。

最近发展了一种制造融合蛋白的新技术，这一方法的优点是：① 改进了蛋白质的稳定性。② 这些性质的改善使得能够从培养抽提液中分离蛋白质。③加快了分离。④使得生物工程公司生产大量的酶或高纯度的药物能够获得应用。

如果一个蛋白质的表达水平较低或者纯化过程复杂，则应该制备融合蛋白（Scopes 1994；Schein 1989）。一般来说是将编码蛋白的基因 DNA 与融合 DNA 在上游或下游相连，为了简化纯化步骤，用作融合蛋白的肽链部分可以采用多聚精氨酸或多聚组氨酸（在 C 端）、蛋白 A 或谷胱甘肽转移酶(GST)。因此纯化步骤可以通过离子交换柱（对多聚精氨酸）、免疫亲和柱（配基 IgG）或底物亲和层析柱（谷胱甘肽）很容易地实现。融合的部分则可以通过适当的蛋白酶降解除去（如果编码蛋白的羧末端接的是多聚精氨酸，还可以通过羧肽酶 B 降解除去）而得到天然蛋白（Scopes 1994；Sassenfeld 1990；Enfords 1992）。

1.4 膜结合蛋白的纯化

从膜上提取蛋白有许多困难（Harris and Angal 1989，1990；Scopes 1994）。在多数情况下，都是采用去垢剂将疏水蛋白从其膜结构中溶解下来，然后将蛋白质稳定。去垢剂的选择通常是依据它对所需要蛋白质的提取效率来确定，但在某些情况下还要考虑到以后的纯化步骤（Scopes 1994）。采用小体积的少量去垢剂较好，采用高的严格的胶束浓度的去垢剂如乙烷基葡萄糖苷可以改善纯化步骤，最有效的去垢剂是强离子性的硫酸盐，如十二烷基硫酸盐（SDS）和阳离子去垢剂，如十六烷基-三甲基铵溴化物。在去垢剂的存在下，纯化主要是根据蛋白质分子量的大小用凝胶电泳进行分离。

虽然许多膜蛋白必须在去垢剂存在下进行纯化，但最终可能仍需要除去去垢剂（Buse et al. 1986）。在许多场合这将会引起蛋白质失活，但若蛋白质是用于测序的，它将不是一个问题。也可采用能够吸附去垢剂的疏水珠（Furth 1980）。

膜蛋白可以划分为两大类，即外膜蛋白(外源膜蛋白)和内膜蛋白(内源膜蛋白)。

外膜蛋白是通过与其他蛋白或暴露的磷脂区之间的相互作用而结合在膜上。这时通过缓冲液离子条件的改变或在比较富有弹性的条件下引入一定程度的变性作用，可以使这类膜蛋白从膜上解离下来。这里应该强调，外膜蛋白结合得比较松，一旦解离下来之后，不需要去垢剂或其他溶解剂即可保持在缓冲液中，因此，这类蛋白质当其一旦被提取出来并除去所用的去垢剂之后，即可像其他可溶性蛋白质的纯化一样进行纯化。在所有的膜的操作中，都应加入蛋白酶抑制剂，因为蛋白酶可因 EDTA 或巯基(-SH)试剂等

的存在而被活化。为了防止不可逆的蛋白变性作用，缓冲液的 pH 值应保持在 6～8 之间，而且所有的操作都必须在 0℃下进行。

整合的膜蛋白是与脂双层膜的疏水部分相接触。根据它们在结构上与脂双层接触的比例可分为四类。对于可溶性整合膜蛋白的纯化，需要将多肽链从其锚靠的膜上分离出来（Harris and Angal 1990；Scopes 1994）。

— 第Ⅰ类：通过一个或两个跨膜的蛋白片段整合进膜。

— 第Ⅱ类：利用与脂肪酸或脂的共价结合。

对于这两类膜整合蛋白，脂双层仅仅是起了一个结构支持物或者是定位化和组织化的作用，属于这类蛋白的例子是许多酶类，如肽酶、酯酶和磷脂酶等。这两类蛋白与膜的分离可以采用蛋白酶或磷脂酶 C 和 D 处理来实现。用磷脂酶 C 处理时，一般将二乙酰甘油留在脂双层上；而用磷脂酶 D 处理时肌醇连接蛋白被释放出来，而将磷脂酶后面的部分留了下来（Harris and Angal 1990；Penefsky and Tzagoloff 1971）。当用磷脂酶时需要特别注意，长时间的保温会造成膜蛋白分子内的肽链被降解。

— 第Ⅲ类：含有一个跨膜片段。第三类蛋白的全部生物活性不仅决定于两个亲水结构域，而且也决定于跨膜片段，这类蛋白包括各种受体，生长因子和 LDL 蛋白。在水相中呈球状蛋白的部分可以通过蛋白酶的水解而与分子的其他部分断开而得到。在此条件下，胞外结构域仍可能保留配基结合活性。

— 第Ⅳ类：这类蛋白跨膜好几次，整个结构中有很大一部分是在疏水相中，作为这类蛋白的例子有转移蛋白、受体和视紫红质类蛋白。虽然蛋白酶能够从这类蛋白中切出能够溶于水相的片段，但要溶解跨膜片段则需要有机溶剂、去垢剂或离液剂。膜部分或亚细胞器可以用多种方法分离，最成功的是用密度梯度离心。

膜组成部分或亚细胞器，可用若干不同的方法分离，其中最成功的是离心，通常用密度梯度离心。其他的方法包括有机溶剂双相分配、高压自由电泳、免疫亲和层析或凝胶过滤层析（Scopes 1994）。分离可溶形式的膜蛋白可以通过下述一种或多种处理相结合的方法来实现（Penefsky and Tzagoloff 1971）。超声、金属螯合试剂（1～10 mmol/L 的 EDTA，EGTA）、温和的碱处理（pH8～11）、高离子强度（1 mol/L NaCl）、磷脂酶处理等。膜蛋白的活性不应该丧失并应以可溶形式在溶液中保持活性。因此，发展新的去垢剂或层析树脂对于成功地纯化这类疏水蛋白是很需要的。

（陈常庆 译）

参 考 文 献

Buse G, Steffens GJ, Steffens GCM, Meinecke K, Hensel S, Reumkens J(1986) Sequence analysis of complex membrane proteins (cytochrome c oxidase). In: B. Wittmann-Liebold et al. (eds) Advanced methods in protein microsequence analysis. Springer, Berlin Heidelberg, New York, pp 340–351

Enfords SO (1992) Control of in vivo proteolysis in the production of recombinant proteins. Trends in Biotechnol 10: 310–315

Furth AJ (1980) Removing unbound detergent from hydrophobic proteins. Anal. Biochem 109, 207–215

Harris ELV, Angal S (1990) Protein purification applications: a practical ap-

proach, IRL, Oxford
Harris ELV, Angal S(1989) Protein purification applications: a practical approach. IRL, Oxford
Hoess A, Arthur A K, Wanner G, Fanning E (1988) Recovery of soluble, biologically active recombinant proteins from total bacterial lysates using ion exchange resin. Biotechnology 6: 1214–1217
Marston FLA, Angal S, Lowe PA, Chan M, Hill CR (1988) Scale- up of the recovery and reactivation of recombinant proteins. Biochem Soc Tran. 16: 112–115
Marston FAO (1986) The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *E. coli*. Biochemical J 240: 1–12
Penefsky HS, Tzagoloff A (1971) Extraction of water soluble enzymes and proteins from membranes. Methods in Enzymol 22: 204–219
Sassenfeld H M (1990) Engineering protein for purification. Trends Biotechnol 8: 88–93
Schein CH (1989) Production of soluble recombinant proteins in bacteria. Biotechnology 7:1141–1149
Scopes RK (1994) Protein purification: principles and practice (3rd edn). Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 1–380
van Kimmenade A, Bond M W, Schumacher JH, Laquoi C, Kastelein RA (1988) Expression, renaturation and purification of recombinant human interleukin 4 from *E. coli*. Eur J Biochem 173, 109–114

第2章

蛋白质的亲和层析

H. Wombacher, L. Jacob

2.1 背景和短评

分子间的专一性相互作用是所有生物学过程的基础。特别是蛋白质同特异结合组分之间的相互作用已经相当明确，即酶与底物、激活剂和抑制剂之间的相互作用，抗体与抗原之间的相互作用以及某些蛋白与DNA/RNA的特定区域之间或者受体与其对应的效应分子如激素和递质（transmitters）之间的相互作用。亲和层析技术即是建立在此生物特异亲和性的基础之上。固定在层析介质骨架上的结合分子称为配体，要纯化的蛋白称为反配体或目的蛋白。目的蛋白通过它表面上的生物功能位点，特异并可逆地结合在固定的配体上。因此，利用蛋白质的特异结构，亲和层析可以使大多数蛋白纯化到接近单一的组分（综述参阅 Scouten 1981；Wilcheck et al. 1984）。

2.1.1 亲和作用和配体的分类

固定在固相载体上的配体应该具有与目的蛋白能够选择性地结合并形成稳定复合物的能力。选择性地结合形成复合物的稳定性很主要地是取决于配体与蛋白质结合位点之间结合的紧密程度，但考虑到结合的特异性，起决定性作用的是弱相互作用力，即范德华作用力，其键强度与距离的7次方成反比[1]。由于这个理由，足够强的结合要求配体能精确地嵌合在结合位点内，此外，从动态上考虑，精确的强的结合也可以通过构象的改变来得到进一步加强，这种构象上的改变有时也称为诱导契合。在多数场合，结合常数（K_a）的范围在 $10^5 \sim 10^8\ M^{-1}$时，最适合用于亲和层析过程。当亲和力过低时，与目的蛋白的相互作用不强，在层析过程中拉不牢目的蛋白，结果是选择性过低。如果亲和力太高，蛋白质的洗脱需要用激烈的和苛刻的，有时甚至是变性的条件。此外，目的蛋白在柱上有很强的结合并不意味着是特异的结合，还必须考虑到在目的蛋白同层析介质之间可能存在着很强的非特异性的吸附结合力，它们可能与特异结合力之间是重叠的或者是相加的，就这个关系来说，特异结合是指局限在蛋白质表面结合位点上的那种吸附。

为了更容易理解的目的，配体被划分成单特异性的或组特异性的，它们进一步还可

1）这里可能是指作用力，如果键强度是以能量计算，则应是与距离的6次方成反比。——译者注

区分为低分子量配体或高分子量(大分子)配体。

单特异性配体

它是指这样一类配体，即只结合一个或者很小数量的蛋白质，甾体激素和酶抑制剂即属于这类配体。一个很熟悉的例子就是低分子量的生物素配体（生物素-抗生物素蛋白/链酶抗生物素蛋白的 $K_a = 10^{15} M^{-1}$）。这个高度特异的强的结合在类似于 AFC 的生化方法中已经成为一个很有用的工具（参阅 Wilchek and Bayer 1990）。

大分子的单特异性配体

抗体-抗原结合是大分子单特异性配体及其目的蛋白的最重要的例子。抗体作为连接在层析介质上的配体，对于纯化可溶蛋白、多肽、溶解的膜蛋白，甚至病毒和细胞来说是一个很有用的工具。随着现代杂交瘤技术的出现，多克隆抗体制备能够用单克隆抗体代替（有关的实践和理论可参阅 Peters and Baumgarten 1989）。对于任何一种抗原蛋白，即使它在总的免疫原中只有非常低的浓度，都有可能得到高度特异性的抗体。选用适当的筛选方法能够得到制造所需要特异性和亲和性的抗体的杂交瘤细胞（Tijssen 1985）。当将这类抗体固定在适当的层析介质上以后，就能够纯化所需要的抗原。

组特异性配体

组特异性是指这样一类配体，像辅酶、维生素/辅因子或它们的类似物，它们可以同几种不同蛋白的共同位点相结合。组特异性配体包括 ATP 和 NAD，其靶蛋白有辅因子依赖的酶，如 NAD 和 NADP 依赖的脱氢酶。

大分子组特异性配体

凝集素和一些免疫球蛋白结合蛋白可以看成是组特异性的大分子配体，固定化的凝集素对于糖基是高度特异的。例如，伴刀豆球蛋白（ConA）是通过与 α-D-甘露吡喃糖基、α-D-葡糖吡喃糖基及立体相关基团的结合来纯化某些糖蛋白，葡萄球菌蛋白 A 和链霉素蛋白 G 是抗体亲和层析中的特异配体（表 2.1）。

表 2.1　蛋白 A、蛋白 G 和果胶 EMD TA 的抗体结合特征

抗体	果胶 EMD TA	蛋白 A	蛋白 G
人 IgG1	+	+	+
人 IgG2	+	+	+
人 IgG3	+	-	+
人 IgG4	+	+	+
人 IgM	+	+	-
人 IgA	+	+	-
小鼠 IgG1	+	弱	+
小鼠 IgG2a	+	+	+
小鼠 IgG2b	+	+	+
小鼠 IgG3	+	-	+
大鼠 IgG1	+	弱	+

续表

抗体	果胶 EMD TA	蛋白 A	蛋白 G
大鼠 IgG2a	+	−	+
马 IgG	+	−	+
山羊 IgG	+	+	+
鸡 IgG	+	−	−
牛 IgG	+	弱	+
兔 IgG	+	+	+
羊 IgG	+	−	+
狗 IgG	+	+	−
猪 IgG	+	+	+
猫 IgG	+	+	−
鸡（yolk）IgY	+	−	−
重组抗体：scFv	+	−	−

2.1.2 假生物特异性亲和作用和人工配体

一些特殊人工化合物，如蒽醌或偶氮染料，由于它们对多种不同的蛋白如脱氢酶、激酶、转移酶、还原酶等都具有亲和性，因而能够成功地用作配体以纯化这些蛋白质。在某些情况下，所谓的生物模拟相互作用被认为是由于人工配体对在各种蛋白上进化过程中保持不变的二核苷酸折叠（dinucleotide-fold）区选择性地结合的结果，虽然对其与蛋白质的相互作用还没有搞清楚，但这类亲和层析则已非常普遍（Scopes 1987）。假亲和层析，也称为假生物特异性亲和层析，是指人工配体与蛋白质特定基团之间的特异相互作用，在这个意义上来说，甚至也可以包括称为共价层析的配体，如硼酸衍生物和某些糖蛋白之间的共价结合。一般来说，假亲和层析包括了以生物模拟配体为基础的各类吸附层析。

固定化的金属离子亲和层析/亲硫吸附层析

固定化的金属离子亲和层析（IMAC）（Porath and Olin 1983；综述可参阅 Kagedal 1989）和亲硫吸附层析（TAC）（Hutchens and Porath 1986）是假亲和层析的重要例子。TAC 对于免疫球蛋白的纯化比用蛋白 A 作为配体的亲和层析在实用上更有长处。关于 IMAC 和 TAC 的长处及其成功的应用将在 2.2 中说明。

2.1.3 层析载体

作为一个亲和层析载体的基本要求（参阅 Mohr and Pommerening 1985；Narayan and Crane 1990）是：① 具有亲水和中性的骨架；② 好的化学、力学、生物学和热稳定性；③ 带有附加的功能团如-OH、-NH_2、-COOH 和-CHO 等，它们能通过各种化学反应进行衍生化。特别是对于蛋白质的纯化来说，最好是采用大孔载体。琼脂糖，特别是稳定的交联型琼脂糖是最常用的载体。它具有作为蛋白质亲和层析理想载体的许多特性。载体

的孔状性质或多或少影响扩散物质的转移。这在蛋白质的亲和层析中与目的蛋白的结合和解离的动力学性质一样，都是很重要的。以丙烯酰胺、聚乙烯、聚苯乙烯及由合适的单体形成的特定共聚体为基础的合成高分子，为发展接近理想的带有或不带有固定化所需要的活性基团的载体奠定了基础。除了好的化学和物理学稳定性以外，下面的几种载体也提供了高的大孔性质：Eupergit（Fluka，Neu-Ulm，德国）、Spheron（Waters，Milford，MA，美国）、TSK（Tosohaas，Philadephia，PA，美国）和果胶（Merck，Darmstadt，德国）。此外，最近已经发表了一种用羟基化高分子涂壳的新的改良乙烯苯/二乙烯苯载体。它消除了常规层析中物质转移瓶颈（Regnier 1991）。这个载体的商品名是 POROS，可以从 PerSeptive Biosystems 公司（Cambridge，MA，美国）买到。

2.1.4 固定化方法

配体在载体物质上的固定化经几个步骤完成（方法的详细步骤参阅 Hermanson et al. 1992；Carlson et al. 1995；Dean et al. 1985；Wong 1991）。

载体的活化

像 BrCN、羰基二咪唑、甲苯磺酰氯或三氟乙基磺酰氯、双环氧乙烷、氯甲酸酯、二乙烯基砜和肼等化学试剂（**注意**：有的情况下需要特别的安全保护措施）可用来衍生载体的功能基团。使得产生的亲电基团可以同配体的亲核基团（如-OH，$-NH_2$，-SH）反应，或者相反。而且已有好几种预先活化好的层析载体可以买到商品，特别是如果需要考虑到化学和物理学稳定的大孔性质，则可以选用合成的高分子，如 Fractogel EMD Epoxy 650 或 Fractogel EMD Azlactone 650（Merck，德国）。高容量的活化的环氧乙烷基团或吖内酯基团，通过多点连接在线性高分子链（被称为触角）上而嫁接到 Fractogel 材料上，同传统的间隔链（spacer）技术相比，这种方法对于偶联配体的容量和柔性及蛋白质结合过程都具有一定的优越性，特别是能避免蛋白质和高分子表面之间的非专一性结合（见 2.2）。

配体的偶联

稳定的共价连接多数都是通过配体对活化的载体材料进行亲核进攻来实现的，随后，配体被看成是被固定化的。例如，以环氧乙烷或吖内酯活化的载体材料，形成的是非常稳定的醚键和极其稳定的酯键。相反，BrCN 活化的载体材料则形成很不稳定的碳亚氨脂的结合，再者，在常用的 pH 条件下还产生一种不需要的带电荷的亚氨基。

间隔手臂

若选用小分子作为配体连接在像蛋白质这样的大分子上，则建议采用所谓的间隔手臂。这是将一个两端均带有功能团的短的线状脂肪烷烃链先连接在载体上，并保持末端的游离功能团，它可以通过适当的化学方法与配体偶联。采用间隔分子来偶联小分子配体的主要理由是因为蛋白质与配体结合的位点往往是埋在分子内或者处在低于分子表面的口袋里。直接连接在载体上的配体不可能伸出足够的距离以接触到远离的要结合蛋白

表面的结合位点。因此非常重要的考虑不仅是被固定在载体上的配体绝对数目，而且还需要考虑到它们的可结合能力，因而配体和载体间的间隔分子（或者是在 Fractogel EMD 中所谓的触角），对于改善对目标蛋白的特异性结合，并从而提高对目标蛋白的结合容量是很有帮助的。一个适当的间隔分子也可以阻碍蛋白分子对载体材料表面的非特异性吸附。

定点固定

定点固定（site-directed immobilization）是偶联过程中的一个重要问题。下面的例子即可说明这一点。十分明显，一个二价抗体，只有当抗体分子通过碳氢部分合适地结合在载体上面留下可与抗原相互作用的游离的位点，该抗体的结合潜力才能被充分显示出来。有关在远离抗原结合位点进行共价连接的合适固定的化学问题，Hermanson 等人（1992）早已做过深入的介绍。也有定点固定化是成功地先结合靶蛋白的例子，只有当细胞色素 c 恰当地定位并固定在载体上时，细胞色素 c 氧化酶才能用以细胞色素 c 作为生物功能性配体的亲和层析纯化。

残留活化基团的封闭

在进行亲和层析之前，残留在载体上的活化基团，必须加以失活，这可以通过采用过量的亲水性的低分子量化合物如乙醇胺来实现，但必须避免引入正（NH_3^+）或负（$-COO^-$）电荷，因为它们能够造成不需要的离子交换作用，而且这种作用与 pH 有关，而且也应当防止由于封闭试剂所引起疏水性的增加。

2.1.5 层析操作

样品制备

虽然一步纯化的步骤可能是诱人的，但预处理步骤总的来说还是具有一定的优点：① 颗粒、细胞碎片、膜片段等的除去；② 样品浓缩及除去蛋白酶或其抑制剂。通过蛋白质沉淀或离子交换柱层析对样品进行预处理，很容易除去许多不需要的杂质。在此过程中，速度和回收率是关键的因素，一般来说，不需要有浓缩步骤。

结合步骤

目标蛋白对配体的特异性结合需要最适的 pH、缓冲液盐浓度和离子强度。但很明显，pH 能够调节目标蛋白分子也可能还包括配体分子的电荷基团，因而在结合过程（以及解吸步骤）中具有决定性的作用。

— 中等盐浓度（0.1 ~ 0.15 mol/L NaCl）能够稳定溶液中的蛋白质并防止由于离子交换所引起的非特异性相互作用。
— 去垢剂（如 Tween-20）能够用作保护添加剂以降低由于载体材料的疏水性以及固定化的化学因素和（或）间隔分链（spacer）的性质所引起的非特异性相互作用。
— 很高的盐浓度（例如高达 2 mol/L 的硫酸铵）能特异性地提高配体和靶蛋白的疏水相互作用。

— EDTA（约 10 mmol/L 左右）用于稳定蛋白质中能够被重金属催化氧化的-SH 基。
— 结合缓冲液组成的优化往往也是减少亲和层析中非特异性结合的关键。

柱操作

柱的大小决定于吸附剂的容量和所需要纯化蛋白质的量。一般来说，高的容量可以用于粗的短柱，在多数情况下，可以采用一次性的塑料小柱（例如从美国市场上买到的 Bio Rad 和 Pierce 的产品）和 1 ~ 5 ml 凝胶。柱和柱顶及柱底多孔板的疏水性质（聚苯乙烯和聚丙烯）用 0.1% 的 Tween-20 溶液处理消除。但若靶蛋白通过低结合强度($K_a < 10^4\ M^{-1}$)被滞留在柱材料上，则可以采用较长的柱。此时，所需要蛋白与非结合杂质的分离严格取决于柱的长度。

流速

为了使纯化蛋白能够得到尖的洗脱峰和最小稀释度与最大回收率，则最好使用低的流速。太高的流速会降低分离效果和容量，因为它需要长的时间来达到新的平衡。另一方面，特别是当用可溶性的配体/类似物来进行竞争性洗脱时，解离动力学可能成为速率限制步骤。对于一级反应来说，解离速度常数同蛋白的结合强度间接相关（即半衰期 = ln 2/k – 1)。另一方面，载体材料的大孔性程度又会导致显著的物质转移限制，根据靶蛋白的分子量和形状的不同而异，为此，在竞争试剂上柱之后，特别是对靶蛋白在柱上结合得很紧的情况，停止洗脱 0.5 ~ 2 小时，有时可能会取得好的效果。总的来说，通过亲和柱的线性流速必须进行优化以达到最大的结合容量和最佳的分离。大多数的亲和柱都是在(或)接近于最佳结合水平于重力流速下进行操作的，而 HPLC 则只能用于有足够抗压能力的层析材料。此外，大孔载体材料往往有稳定性不够的缺点，虽然某些合成载体材料，如 Fractogel，具有足够的物理稳定性，因而能够适用于较高的压力（见 2.1.3)。

淋洗

样品吸附在柱上之后，必须用几倍体积的起始缓冲液对柱淋洗以除去不结合的所有物质，以静电作用吸附在柱上的非特异性结合物质，可用稍微增加离子强度的缓冲液淋洗去掉。整个淋洗过程用紫外进行监测，当紫外吸收达到原始的基线时，结束淋洗。

洗脱步骤

洗脱条件的选择像决定最佳结合条件一样同等重要。一个最佳的洗脱条件可以使靶蛋白在最小的体积内达到完全的回收。一般来说，靶蛋白的生物活性也必须保持不变。最基本的方法是用中等浓度（0.2 ~ 1 mol/L 左右）的可溶性配体或类似物在比较温和的解吸条件下(例如中性 pH)竞争性地置换结合蛋白。洗脱方法是逐步性的，采用梯度或分步洗脱，可是，特别强的结合，如生物素-抗生物素蛋白（biotin-avidin）复合物（$K_a = 10^{15} M^{-1}$）的情况，对于这种解吸方法是耐受性的，在这种情况下，除了用高浓度的可溶性配体洗脱外，则需要 6 mol/L 盐酸胍和 pH1.5 这种比较苛刻的条件，使得复合物能够在合理的时间内解离。原则上来说，溶剂的组成对亲和常数有很大的影响。这对于

结合和洗脱来说都是必须加以考虑的。因此，适当改变缓冲溶液对于实现特异性的竞争性洗脱将会是有效的。事实上，在很多场合，特异性洗脱剂完全可以用所谓的非特异性洗脱液代替。当然，人们还必须在洗脱液的苛刻性和引起靶蛋白的变性危险之间进行折衷。下面列举了几种逐渐增加洗脱条件的步骤：

— 改变 pH 和(或)离子强度：例如，可以 NaCl 梯度来洗脱，这主要是用于通过特异的静电相互作用所结合的蛋白质。
— 如果配体和靶蛋白之间主要是疏水相互作用，而且改变 pH 的结果不够有效，则需要用更激烈的条件，如加入乙二醇(到 60%)或 DMSO(到 10%)以降低水溶液的极性。其缺点是这类试剂对粘度有影响而且对多糖结构也有作用。
— 也可以采用高浓度(到 3 mol/L)的离液盐(如 KSCN 或 KI)和(或)中偏高浓度(4 ~ 6 mol/L)的变性剂(如尿素或胍盐)。这类盐能够影响 Eriksson(1989)曾经讨论过的,遵循 Hofmeister 系列的疏水作用。
— 去垢剂也能很有效地作用于疏水结合部位,但它们只能在恰好低于临界的胶态点的浓度下使用。就这个关系上应该指出,在整个纯化过程中特别是在纯化膜蛋白的时候,采用低浓度的去垢剂是会有帮助的。去垢剂可以抑制对柱壁和柱材料的非特异性吸附,并能阻止不希望的蛋白质聚合作用。

当靶蛋白用特异性的或非特异性的或者两者兼而有之的方法洗脱下来之后,必须经过透析或者凝胶过滤以除去洗脱液,如果必要的话,还必须恢复天然构象。

柱的再生

用几倍柱体积的起始缓冲液进行再平衡,一般即足以使亲和柱再生,但一些未知的杂质往往仍结合在柱上,必须用苛刻的处理才能除去,但这会因载体材料的稳定性、配体的性质以及它与载体共价连接的方式不同而受到一定的限制。

2.2 特殊应用及其实验步骤

2.2.1 固定化金属螯合亲和层析

原　理

这种高效纯化方法的基础是共价结合在层析载体上的金属离子螯合剂能与表面含有组氨酸残基的蛋白质相互作用(Porath et al. 1975; Sulkowski 1985)。Fractogel EMD 是选用亚氨基二乙酸作为金属螯合配体,其两个齿状螯合部分在固定化后仍保持自由状态,因而各种金属离子就能结合到静止相上,而特殊的蛋白质或肽就能通过金属离子的自由配位位点结合上去。亚氨基二乙酸是以共价形式高密度地固定在连接臂(即前面讲到过的触角)上,从而保证了高度的亲水性、柔性和结合容量。触角比传统的间隔链分子优越,因为它对蛋白质的结合容量显著增加,例如,对溶菌酶的结合容量大约是 60mg/ml 铜螯合凝胶。另外,由于固定化配体的高度柔性,使金属离子更容易结合在蛋白质表面的结合位点上,有利于络合物的形成,并使蛋白十分牢固地结合在 Fractogel EMD 螯合介质上。当然,蛋白质表面组氨酸残基的结合能力,对于结合蛋白质也十分重要(Hemdan et al. 1989)。

对肽来说，α-氨基也能起到决定性的作用，即使没有组氨酸残基存在也能起到滞留多肽的作用。也有报道认为，其他结合金属的氨基酸，如半胱氨酸和色氨酸也对蛋白质的结合有作用(Hansen and Lindberg 1992,1995)。

重组蛋白质

由于分子生物学的进步，已经能够将组氨酸残基插入蛋白质序列，这些修饰的蛋白质可以被认为是 IMAC 很有希望的纯化对象，能减轻一些重组蛋白纯化的工作量。在必要的时候，蛋白质的融合部分可以在纯化以后用化学或特异性的酶法切除掉。

层析条件

由于组氨酸的 pK 值关系，蛋白质在 Fractogel EMD 螯合柱上的结合，一般在中性 pH 值下进行，但真实的 pK 值可能会因蛋白质的其他邻近氨基酸残基的影响而变化很大，最多可超过 1 个 pH 单位。因此，pH 值 8 的缓冲液通常可以提高蛋白质的结合量，但有些缓冲液在此 pH 值范围内不适用，例如，含 Tris 的缓冲液会降低亲和力，因而它只用于和亲和介质相互作用十分强的蛋白质。从理论上讲，应避免在吸附步骤中使用像咪唑、组氨酸或甘氨酸等能与蛋白质/多肽竞争结合金属离子的物质，但它们显然很适用于洗脱步骤。蛋白质和羧基之间可能会发生一定的离子相互作用，它会阻止蛋白质与金属络合物的结合，故所有螯合柱的操作最好使用高离子强度的缓冲液，0.5 ~ 1mol/L NaCl 就足够了，有时甚至 0.1 mol/L NaCl 可以。洗脱时可使用竞争性分子和(或)通过改变 pH 值来置换蛋白质，蛋白质从柱子上的置换一般在试剂达到一定的浓度时才发生，多数是采用咪唑的梯度。用分级梯度或线性梯度降低 pH 同样可以减少蛋白质-金属离子络合物的亲和力，从而使蛋白质解吸。

IMAC 的优点

与真正的生物专一性亲和层析相比，IMAC 这种“假”生物特异性亲和技术，操作更容易、更快速。IMAC 除了广泛的用途和较低的价格外，还具有能与高盐浓度缓冲液相匹配的优点。由于蛋白质或肽在柱上的结合不受干扰，所以从阴离子或阳离子交换介质上收集下来含有高盐浓度的组分，可以直接上金属螯合亲和柱。这样，在多数情况下，就不需要在上柱前对样品进行更换缓冲液或透析等耗时操作。另外，不同的金属离子都能够络合到柱子上，这样相同的吸附剂就能产生不同的吸附选择性。一般来讲，结合蛋白质能力最强的是铜离子，其次是镍离子，而锌离子和钴离子结合力较弱。

2.2.2 亲硫吸附层析（TAC）

原　理

这类高效的“假”亲和层析是基于盐驱动吸附原理，将蛋白质，特别是抗体，吸附到含有砜基和硫醚基的杂脂肪族配体上的（Porath et al. 1985）。蛋白质的吸附作用主要是通过对色氨酸和苯丙氨酸残基的作用发生在抗体分子保守区中结构域上，因此，含有所谓亲硫区的蛋白质，如免疫球蛋白（Belew et al. 1987）和含有芳香族氨基酸残基的肽

最适于 TAC 纯化。由于白蛋白不能吸附在亲硫介质上，因而大大简化了从血清中高效分离抗体。Fractogel EMD TA 是为抗体的高效纯化而设计的，目前测试过的所有抗体都能结合到 Fractogel EMD TA 上（见表 2.1）。根据最近的研究结果（Schulze et al. 1994），采用亲硫吸附技术成功地实现了对大肠杆菌（*E. coli*）表达的重组单链抗体片段的有效纯化，用这种方法对其他在表面上带有亲硫区的蛋白质和肽的分离纯化结果也已有报道(Bischoff et al. 1994)。Fractogel EMD TA 通过触角原理克服了蛋白结合容量较低的问题。按照前面讲过的方法，触角可以高密度地携带基团特异性配体，因而对 γ-球蛋白的结合容量可达 30 mg/ml 凝胶。触角原理同样能给功能性配体分子提供一个合适的空间，从而减少蛋白质与柱的非特异性相互作用，并赋予柱子高的蛋白质结合容量。

层析条件

由于蛋白质与 Fractogel EMD TA 的结合是一个盐驱动的过程，所以必须考虑盐的类型和浓度对结合效率的影响（见 2.1.5）。硫酸铵浓度在 0.8 ~ 1.5mol/L 之间对抗体的结合能达到最佳的结果。洗脱步骤可以通过盐梯度降低很容易地进行，但在较高的硫酸铵浓度下，Fractogel EMD TA 的结合行为趋向于类似疏水作用层析中(HIC)所用的介质(Eriksson 1989)。

TAC 的优点

对于抗体的纯化来讲，TAC 纯化的最大优点是配体的高的化学稳定性，尤其是与其他生物特异性配体相比，例如，与经常使用的大分子配体蛋白 A 或蛋白 G 相比，显示了它的优点。TAC 方法的另一优点是其与标准的蛋白纯化过程十分相配。经硫酸铵沉淀或离子交换步骤后，样品中残留的盐浓度只需调节（如通过电导测定）到使靶蛋白与柱结合的盐浓度。而且，各种不同来源的抗体蛋白和各种免疫球蛋白都与亲硫吸附剂结合，而蛋白 A 或蛋白 G 的柱只能微弱地结合某些抗体，有些则根本不结合（见表 2.1）。

2.2.3 材料和方法

首先，将详细介绍用 IMAC 柱进行 Fractogel EMD 螯合纯化多肽的过程，随后介绍用 Fractogel EMD TA 进行的抗体 TAC 纯化。两种方法只需稍加修改或不作任何改变即可用于其他多肽或蛋白的分离。

设　备

层析柱可与 HPLC 或其他中等压力的系统相连接，所使用的泵要求保持精确的恒定流速。由于缓冲液中含有高浓度的盐，最好采用惰性泵系统，由于采用惰性系统，柱的使用寿命也可能延长。如果采用高盐缓冲液，不锈钢部件可能会被腐蚀，产生的金属氧化物结合在层析介质上，这可能导致分辨率和回收率的下降，而且最终将损坏层析柱。所需要的最小设备是一个梯度混合仪，一台 UV 检测器（280nm）和一个中压泵。当然，一个程序化的梯度混合系统对于条件的精确控制是十分有用的。如果使用蠕动泵，流速应该用高盐浓度缓冲液进行校正。管道应越短越好，以减少不必要的稀释作用。如果目

的蛋白不太稳定，所有步骤应在4℃进行。

胶的制备

Fractogel EMD 螯合介质和 Fractogel EMD TA 胶以悬浮液形式贮存，在使用前应将贮存溶液除去。

1）振荡装有胶的容器直至获得一均匀的悬浮液。
2）取适当量的胶液（8~10ml 用于装 50cm×10cm 的柱）加入到带有玻璃滤板的漏斗内，抽滤去上清液后，用3倍体积的平衡缓冲液重新悬浮胶，然后抽滤去平衡液，重复操作3次。

装 柱

层析柱应按制造商的说明小心地均匀装柱。长度 5cm，内径为 1cm 的超效柱（Merck, Darmstadt，德国）非常适用于这类层析。

1）在装超效 50-10 柱之前，先用水淋洗柱子。
2）按照操作手册固定柱子，包括下部的接头和上部的进液管，在固定进液管之前先用滤膜安装工具插入下部的滤膜元件（滤膜 F，20μm）。
3）将滤去上清得到的湿胶 6 ml 同 6 ml 1mol/L NaCl 溶液混合，制备成一均匀的悬浮胶。
4）将悬浮胶倒入一垂直固定，出口关闭的柱内，用玻璃棒引流将水倒入进液管中，以充满悬浮胶上的残留空间。
5）将进液管立即与泵相连，打开柱的出口，开泵，以 5~7ml/分钟流速输入平衡缓冲液。
6）待胶在 10~15 分钟内完全装好之后，停泵，并关好柱的出口。
7）倾去或吸出胶床上的上清液，取下进液管。
8）用水淋洗柱的上端，去除多余的胶，使胶的表面与柱的顶端有 5~10 mm 的距离。
9）用装膜工具在胶的顶部插入聚丙烯滤膜板端（滤膜 F，20μm），并用水淋洗滤膜的上部，使滤板上部不应有残留的胶粒。
10）固定上部接头，这样就压紧了整个胶床。
11）用 3~5 倍床体积的平衡缓冲液平衡柱子。

所装柱的柱效可用测试层析图检测基本特征，如峰的对称性；每米柱高度的理论塔板数（N）可以通过在 1 ml/分钟流速下进样 0.1 ml 0.3%丙酮，并用 280 nm 下监测洗脱液得到。如果胶床缩小，松开反向螺旋并重新拧紧接头。

IMAC 的运行

神经降压素、舒缓激肽、血管紧张素、生长激素释放抑制因子和铃蟾肽等的肽混合物可作为展示例子以说明 IMPC 柱对混合物成分的有效分离（见图 2.1）。如前所述，用 Fractogel EMD 650（S）螯合介质填充超效柱，柱的大小为 50mm×10mm，柱床高度 5cm。同样的条件也可用于纯化其他蛋白或多肽：

1）用缓冲液 A：20 mmol/L 磷酸钠缓冲液，1mol/L NaCl（pH7.0）平衡填充柱，以 1 ml/分钟流速进行以下所有步骤。

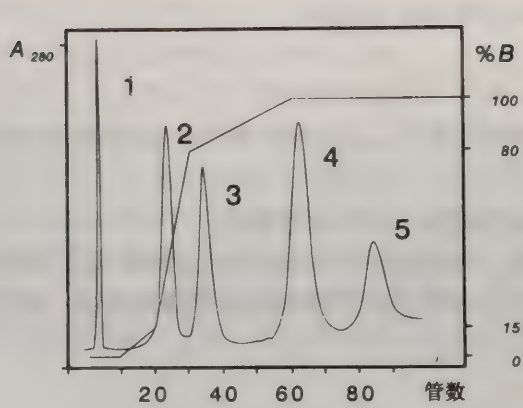


图 2.1　IDA-Cu（Ⅱ）柱上的肽层析图谱。将神经降压素、舒缓激肽、生长激素释放抑制因子、血管紧张素和铃蟾肽混合物上样于螯合有 Cu（Ⅱ）的 IDA-Fractogel EMD 螯合柱。用 0.02 mol/L 磷酸钠，1 mol/L NaCl（pH7.0）的缓冲液平衡柱，洗柱之后用 0.1 mol/L 磷酸钠，1mol/L NaCl（pH3.8）在流速为 1 ml/分钟下进行 pH 梯度洗脱（见图）。神经降压素（峰 1）与柱不结合，在洗涤步骤中即被洗下；具有最强结合力的为含有组氨酸的铃蟾肽（峰 4）和血管紧张素Ⅲ（峰 5）。含有丝氨酸的肽、舒缓激肽（峰 2）和生长激素释放抑制因子（峰 3）表现出较弱的亲和力。

2）用 2 倍柱体积的 NaCl 溶液洗柱，以完全去除磷酸盐。

3）将稀释于 0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液（pH 6.0）中的 250 mmol/L $CuSO_4$溶液上柱，用泵将溶液通过柱子，一倍床体积的金属盐溶液即足够了。

4）用 2 倍柱体积的 1 mol/L NaCl 溶液洗去未结合的金属离子。

5）用 2 倍柱体积的缓冲液 A 重新平衡柱子。

6）按下列浓度制备多肽样品：

— 0.1 mg 神经降压素溶于 1 ml 缓冲液 A

— 0.1 mg 舒缓激肽溶于 1 ml 缓冲液 A

— 0.2 mg 血管紧张素Ⅲ溶于 1 ml 缓冲液 A

— 0.2 mg 生长激素释放抑制因子溶于 1 ml 缓冲液 A

— 0.4 mg 铃蟾肽溶于 1 ml 缓冲液 A

7）取上述样品各 0.5 ml 混合，制备成混合样品。

8）取 2.5 ml 混合样品上柱，并用缓冲液 A 洗至基线恒定，神经降压素由于不能被吸附，10 分钟后即被洗脱，形成峰 1（图 2.1）。

9）余下的肽用缓冲液 B：100 mmol/L 磷酸钠缓冲液，1 mol/L NaCl（pH3.8）溶液洗脱，洗脱梯度为：

— 0%～15%缓冲液 B，10 分钟

— 15%～80%缓冲液 B，20 分钟，以洗脱舒缓激肽

— 80%～100%缓冲液 B，30 分钟，以洗脱生长激素释放抑制因子

— 100%缓冲液 B，40 分钟，以洗脱铃蟾肽和血管紧张素

其他类型的洗脱

例如，也可以用含有0.5~1 mol/L NaCl的0.1mol/L醋酸钠缓冲液（pH3.0）。此外，结合蛋白还可以采用通过调节含盐磷酸盐的pH到4.0或6.0所产生的逐步降低pH梯度从柱上进行洗脱；也可以使用咪唑梯度对IMAC柱洗脱，这时柱子必须预先用含有1mmol/L咪唑的缓冲液平衡，即20 mmol/L磷酸钠缓冲液，0.5或1 mol/L NaCl，1 mmol/L咪唑（pH7.5）。实际的洗脱发生在含有1~200mmol/L咪唑的平衡缓冲液梯度下，对于内径为1 cm的柱子，流速可增加至5 ml/分钟（线性流速大约380cm/小时）。

再生和保存

金属离子螯合柱的再生，需要用泵将大约1倍体积的0.1~1mol/L HCl溶液以0.5ml/分钟流速冲洗柱子，除去所有的金属离子。当用2倍柱体积的50mmol/L磷酸缓冲液，1mmol/L NaCl（pH7.0）洗柱后，柱子即可以再进行金属离子的螯合。Fractogel EMD螯合载体对碱处理也稳定，因此，柱子可以用0.5mol/L NaOH清洗，柱子的贮存，应该采用由平衡缓冲液制备的20%乙醇溶液。

问题及处理

- 由于采用了高盐浓度，可能会发生蛋白质的沉淀。在进行层析之前，必须将样品过滤或用台式离心机离心的方法将沉淀化合物除去。
- 如果目的化合物的结合太强，采用其他的金属盐可能会获得更好的结果，因此，上样这步可以用250 mmol/L的$NiCl_2$、$CoCl_2$或$ZnCl_2$溶液；$MnCl_2$或$MgCl_2$也可能有效。
- 有时必须加入某种物质，使缓冲液稍有改变，以稳定靶蛋白，如从酵母中纯化葡糖激酶，采用具有下列组成的缓冲液A是成功的：20mmol/L磷酸缓冲液，1mol/L KCl，10 mmol/L葡萄糖(pH7.5)，用固定化的钴离子进行IMAC，用pH为4.0的缓冲液A产生的递减咪唑梯度洗脱，可以得到该酶的单峰（Jacob et al. 1991）。

TAC的操作

下列方法可以作为用TAC法分离抗体的标准步骤（见图2.2）。按前面讲过的步骤，用Fractogel EMD TA(S)填装超效柱，柱的大小为50mm×10mm，柱床高度为5cm。

1）用5倍柱床体积的缓冲液A〔含0.8mol/L $(NH_4)_2SO_4$的20 mmol/L磷酸缓冲液(pH7.0)〕，平衡层析柱，流速为2ml/分钟，以后各步的流速均为1ml/分钟。

2）按以下浓度制备人γ-球蛋白和人血清白蛋白溶液：

将2mg人γ-球蛋白（Serva，Heidelberg，德国）溶于1 ml缓冲液A

将5mg人血清白蛋白（Sigma，Heidelberg，德国）溶于1ml缓冲液A

3）取上述每种溶液0.1ml混合最终样品溶液。

4）取0.2ml混合样品上柱。

5）按着用缓冲液A洗柱，以除去不结合的蛋白（白蛋白），直到UV基线恒定。

6）用30ml在缓冲液A中的0.8~0mol/L硫酸铵的线性梯度（缓冲液B在30分钟内同由0%~100%即流速为1ml/分钟，缓冲液B为20mmol/L磷酸盐，不含硫酸铵，并

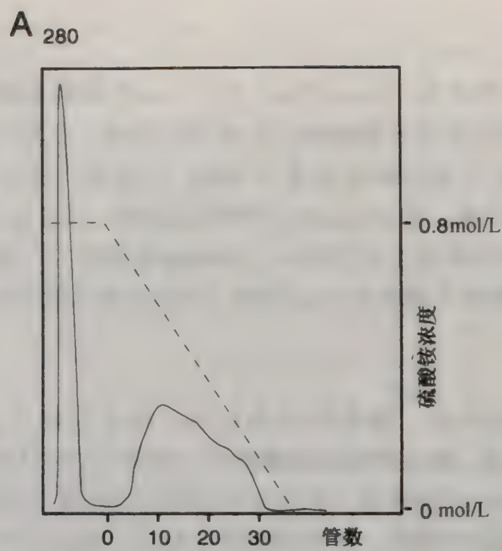


图 2.2 抗体在 Fractogel EMD TA 650（S）上的亲硫吸附层析。将含有白蛋白和免疫球蛋白的混合样品上 Fractogel TA 柱，柱的大小为 50mm × 10mm，用含有 0.8mol/L 硫酸铵的 20mmol/L 磷酸钠缓冲液（pH7.0）先平衡，用无硫酸铵的 20mmol/L 磷酸钠缓冲液 B 组成的递降硫酸铵梯度洗脱，流速为 1ml/分钟。第一个峰为不结合的白蛋白组分，多克隆抗体可用递减的盐梯度进行洗脱。

调节到 pH7.0）洗脱结合蛋白。

7）抗体洗脱后用 2 倍柱体积的缓冲液 B 洗柱。

8）用 2 倍柱体积的 0.1mol/L NaOH 溶液在 0.5ml/分钟流速下对柱进行再生。

其他类型洗脱

此外，结合蛋白还可用递减的硫酸铵浓度线性梯度与递升的乙二醇浓度线性梯度（0% ~ 50%）相结合的方法从柱上洗脱。对于内径为 1cm 的柱子，流速可增加至5ml/分钟（线性流速大约为 380cm/小时），虽然柱的容量将略有下降。

柱的再生与保存

用 NaOH 溶液短期处理最适用于 Fractogel EMD TA 的再生，即用 2 倍柱床体积的 0.1mol/L NaOH 溶液在流速为 0.5ml/分钟条件下淋洗柱子，也可以用 50% 乙二醇溶液淋洗再生。从柱上除去结合得很紧或变性物质的另一个成功方法是用 6mol/L 尿素洗柱。若用有机溶剂进行再生，线性流速不应超过 1cm/分钟。建议采用 20%（v/v）乙醇溶液进行柱的保存。

（陈常庆 译）

参考文献

Azzi A, Bill K, Broger C (1982) Affinity chromatographic purification of cytochrome c binding enzymes. Proc Natl Acad Sci USA 79:2447–2450

Belew M, Juntti N, Larsson A and Porath J (1987) A one-step purification method for monoclonal antibodies based on salt-promoted adsorption chromatography on a thiophilic adsorbent. J Immunol Methods 102:173–182

Bischoff FR, Klebe C, Kretschmer J, Wittinghofer A, Ponstingl H (1994) RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related RAN. Proc Natl Acad Sci USA 91:2587–2591

Carlsson J, Janson JC, Sparrman M (1989) Affinity chromatography. In:Janson JC, Ryden L (eds) Protein purification. VHC, New York, pp 275–329

Dean PDG, Johnson WS, Middle FA (1985) Affinity chromatography. IRL, Oxford

Eriksson KO (1989) Hydrophobic interaction chromatography. In:Janson JC, Ryden L (eds) Protein purification. VHC, New York, pp 207–226

Hansen P, and Lindberg GJ (1992) Immobilized metal ion affinity chromatography of synthetic peptides - binding via the alpha-amino group. J Chromatogr 627:125–135

Hansen P, Lindberg GJ (1995) Importance of the alpha-amino group in the selective purification of synthetic histidine peptides by immobilized metal ion affinity chromatography. J Chromatogr A 690:155–159

Hemdan ES, Zhao YJ, Sulkowski E, Porath J (1989) Surface topography of histidine residues: A facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography. Proc Natl Acad Sci USA 86:1811–1815

Hermanson GT, Mallia AK, Smith PK (1992) Immobilized affinity ligand techniques. Academic, London

Hutchens TW, Porath J (1986) Thiophilic adsorption of the immunoglobulins-Analysis of conditions optimal for selective immobilization and purification. Anal Biochem 159: 217–226

Jacob L, Beecken V, Rose M, Entian KD, Bartunik LJ, Bartunik HD (1991) Purification of yeast glucokinase by immobilized metal affinity chromatography. Biological Chemistry Hoppe-Seyler 372:683

Kagedal L (1989) Immobilized metal ion affinity chromatography. In:Janson JC, Ryden L(eds) Protein purification. VHC, New York, pp 227–251

Mohr P, Pommerening K(1985) Affinity chromatography. Marcel Dekker, New York

Narayan SR, Crane LJ (1990) Affinity chromatography supports: a look at performance requirements. Trends in Biotechnology 8:12–16

Peters JH, Baumgarten (eds.) (1989) Monoklonale Antikörper, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, London

Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. Nature 258:598–599

Porath J, Maisano F, Belew M (1985) Thiophilic adsorption – A new method for protein fractionation. FEBS Lett 185:306–310

Porath J, Olin B (1983) Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. Biochemistry 22: 1621–1630

Regnier FE (1991) Perfusion chromatography. Nature 350:634–635

Schulze R, Kontermann R, Queitsch I, Dübel S, Bautz E (1994) Thiophilic adsorption chromatography of recombinant single-chain antibody fragments. Analytical Biochemistry 220:212–214

Scopes RK (1987) Dye-ligand and multifunctional adsorbents: an empirical approach to affinity chromatography. Analytical Biochemistry 165: 235–246

Scouten WH (1981) Affinity chromatography. Wiley, London

Sulkowski E (1985) Purification of proteins by IMAC. Trends in Biotechnology 3:1–7

Tijssen P (1985) Practice and theory of enzyme immunoassays. Elsevier, Amsterdam, pp 43–78
Wilcheck M, Bayer EA (1990) Avidin-biotin technology. In: Methods Enzymol, vol. 184 , Academic, London, pp 5–45
Wilchek M, Miron T, Kohn J. (1984) Affinity chromatography. In: W.B. Jakoby (ed.) Methods Enzymol, vol 104 Academic, London, pp 3–55
Wong SS (1991) Chemistry of protein conjugation and cross-linking. CRC, Boston

第3章

双向水溶液系统的蛋白质纯化

H. Schütte

3.1 引　　言

在有机化学中，液-液分配技术是一种非常成熟并已建立的分离技术。然而，在纯化微生物来源的生物活性蛋白质过程中，由于有机溶剂往往会引起蛋白质的变性或沉淀而不能使用这一技术；另一方面，生物活性蛋白的分离可以在含水量达到90%的水两相系统中进行（详细介绍见 Albertsson 1986）。一些与水混合多聚物的不相容性导致这些相的形成。如果一个含有高水溶性的多聚物（如聚乙二醇）溶液与另一个高水溶性多聚物（如葡聚糖）的溶液混合，就可以得到依赖于多聚物浓度的两相系统。水相系统同样可以用一种多聚物和一种盐(如磷酸钾)来组成。在图 3.1 中，显示了聚乙二醇/磷酸钾和聚乙二醇/葡聚糖两相系统的相图（Albertsson 1986; Kroner et al. 1982)。在双节点曲线下面，可以获得一均匀的溶液；但如果超出某一浓度即发生两相分离形成 PEG 富集的上层相及盐富集的下层相，这时两相将不再混溶，尽管事实上两相中均含有大量的水（>75%）。从点 T 经 M 至点 B（图 3.1 a）的连线代表组成的混合液均产生相同组成的上、下层相，但相体积不相同。同一线上的两相系统因此具有相同的分配系数。在转折点 C，加入少量的水能将两相系统转化为均一的单相，这两相在理论上应具有相同的组成和体积及分配系数 1。分配系数由方程（1）决定：

$$K = \frac{C_T}{C_B} \tag{1}$$

C_T 和 C_B 分别是化合物在上层和下层相中的平衡浓度。在相当大的浓度范围内及一个确定的系统中，生物活性蛋白或酶的分配系数是恒定的。为了使整个系统所含的能量最少，任何分子在相中为了达到最大数目的相互作用而聚集。Brönstedt 方程式为：

$$K = e^{\frac{\lambda \cdot M}{k \cdot T}} \tag{2}$$

其中 λ 是相系统以及与相应化合物相互作用的特征常数，M 为分子量，k 是 Boltzmann 常数，T 为绝对温度，定量叙述了分配系数与分子量和 λ 因子的指数关系（λ 未知）。如果是大分子量化合物，如讨论的化合物分子量 $M > 10^6$，单相分布可以产生分配系数的巨大变化。

盐对于蛋白质的分配有重要影响，因为蛋白质的分配主要由离子的种类和比例以及它们对相的不同亲和力决定。盐离子的不均匀分布是造成相间静电势差异的原因。对于一个盐来说，如果其离子所带电荷为 Z^+ 和 Z^-，则其静电位可由下式得出（Albertsson et

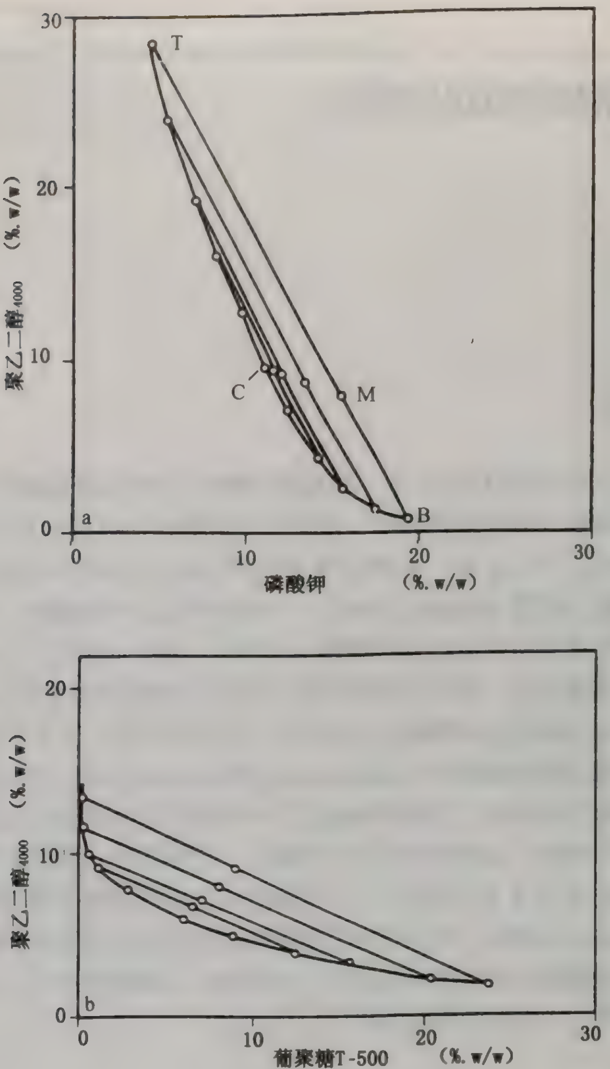


图 3.1　a. 20℃时聚乙二醇 4000/磷酸钾系统的相图。C. 临界点；T. 上层相组成；B. 下层相组成；M. 两相组成。b.20℃聚乙二醇/葡聚糖 T-500 相图（Albertsson 1986）。

al. 1990)：

$$\Psi = \frac{R \cdot T}{(Z^+ + Z^-) \cdot F} \ln \frac{K^-}{K^+} \tag{3}$$

R 为气体常数，T 是绝对温度，Z^+ 和 Z^- 为离子的电荷数，F 为法拉第常数，K^+ 和 K^- 为离子在没有电势存在时的假定分布常数，Ψ 是界面电势，K^+ 对 K^- 之比越大，界面电势也越大。在过量盐存在情况下，蛋白将按公式（4）分配：

$$\ln K_p = K_p^o + \frac{F \cdot Z}{R \cdot T} \cdot \Psi \tag{4}$$

K_p 为该蛋白质的分配系数，K_p^o 为当界面电位(由过量盐产生的)为零或蛋白的净电荷为

零时的 K_p 值，Z 为蛋白质的净电荷。

根据公式（3），盐离子的不同分配产生了一个界面电位，它反过来又按照公式（4）影响蛋白质的分配。

蛋白质及其他化合物在水两相系统中的分配受到许多因素的影响，一些重要的因素见表 3.1。其中所列的各种因素如果不是全部，至少其中主要的因素经确定不是独立起作用的，因此，目前对于一个给定的蛋白质，要计算或从理论上预测其分配常数是不可能的。通过实验可以找到达到理想分配状况的合适条件。如果能得到目标化合物的快速分析鉴定方法，将相当有帮助。在任何分析体积下，分配常数的实验结果重现性一般在 5% 范围内。该方法的一些基本方面及其不同运用在两本书（Albertsson 1986；Walter et al．1985）和一些综述中已有讨论（Kula et al．1982；Hustedt et al．1985 a，b）。

表 3.1　在水两相系统中影响分配系数的因素

组成两相系统的多聚物类型
多聚物的平均分子量
多聚物的分子量分布
连接线的长度（浓度的复杂功能）
组成或加入系统的离子类型
离子强度
pH
温度

3.2　从微生物匀浆中去除细胞碎片

为了将细胞破碎后的胞内蛋白和细胞碎片分离，必须建立使靶蛋白和细胞碎片分配至不同相的条件；然而同时，蛋白的分配系数和两相的体积比必须满足获得高产量的蛋白质。在 PEG /盐系统中，将细胞碎片分配至盐富集的下层相相当容易。例如：在一个由 18%（w/w）PEG 1540，7%(w/w)磷酸钾和 20%(w/w)破裂细胞组成的系统中，许多微生物，如酵母、细菌等的细胞碎片，均定量分配至下层液相中，18/7 的混合比明显位于携带系统的双节点曲线之下（见图 3.1），表明破裂细胞中的多聚物如预期那样导致相的形成。

细胞碎片分配至下层相并不意味着所要的蛋白质一定分配至上层相中。这通常很难达到。对于这一问题，没有一般的规律可循，而必须靠经验来解决，其中重要的因素包括 PEG 的分子量、系统的 pH 值、盐和细胞匀浆的浓度及其他因素（见表 3.1）。通过这些因素的充分变化和组合，可以获得所有条件下的适合提取过程的条件。表 3.2 总结了从不同微生物的破裂细胞中提取一些酶的典型数据，同时总结如下：

- 在许多情况下用单步提取可获得超过 90% 的实际收率。
- 分配系数主要在 2～20 之间。
- 在许多情况下，大量的杂蛋白（可达 90%）与细胞碎片一起可以与靶蛋白进行分离。
- 在许多情况下可以使用 PEG/盐系统。
- 在相系统中细胞匀浆的浓度主要在 20%～30%（w/w）之间。

表 3.2 从细胞匀浆中分离提取酶

来源	酶	相体系组成	$K_{酶}$	产量（%）
Candida boidinii	甲醛脱氢酶	PEG 4000/粗葡聚糖	10.8	94
	甲酸脱氢酶	PEG 4000/粗葡聚糖	7.0	91
	甲酸脱氢酶	PEG 1000/磷酸钾	4.9	94
	异丙醇脱氢酶	PEG 1000/磷酸钾	18.8	98
Saccharomyces carlsbergensis	α-葡糖苷酶	PEG 4000/葡聚糖 T-500	1.5	75
Saccharomyces cerevisiae	α-葡糖苷酶	PEG 4000/葡聚糖 T-500	2.5	86
	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	PEG 1000/磷酸钾	4.1	91
Streptomyces species	葡萄糖异构酶	PEG 1550/磷酸钾	3.0	86
Klebsiella pneumoniae	支链淀粉酶	PEG 4000/葡聚糖 T-500	2.96	91
	磷酸化酶	PEG 1550/葡聚糖 T-500	1.4	85
Escherichia coli	异亮氨酸 tRNA 合成酶	PEG 6000/磷酸钾	3.6	93
	延胡索酸酶	PEG 1550/磷酸钾	3.2	93
	天冬氨酸酶	PEG 1550/磷酸钾	5.7	96
	青霉素酰化酶	PEG 4000/粗葡聚糖	1.7	90
Bacillus sphaericus	亮氨酸脱氢酶	PEG 4000/粗葡聚糖	9.5	98
Bacillus species	葡萄糖脱氢酶	PEG 4000/粗葡聚糖	3.2	95
Brevibacterium ammoniagenus	延胡索酸酶	PEG 1550/磷酸钾	0.24	90
Lactobacillus species	乳酸脱氢酶	PEG 4000/葡聚糖 PL-500	6.3	95

在相体系中杂蛋白和细胞碎片的去除是上述处理过程的一个重要经济因素，这样就可以省略 1～2 步与细胞碎片在一起的杂蛋白的起始纯化步骤，而通常这些步骤一般在细胞碎片用过滤或离心法去除后进行。此外，大多数核苷酸和多糖化合物在第一步提取中也可能被除去。另一重要方面是所用的多聚物增强了酶活性的稳定性。分离过程可以在室温下进行而无需冷却。

3.3 如何寻找合适的分配条件

探索性实验

探索性实验一般是在 10g 规模上进行，使用的多聚物贮存液(葡聚糖 20%，PEG 50%，盐 40%)均按重量比配制。例如，不同量的 PEG 1540 和盐贮存液均先称重并置于 10 ml 梯度离心管中。盐和 PEG 可以以固体的形式或如前述的浓的贮存液加入细胞匀浆，调节 pH 值并固定，加入水至系统的总重量为 10g。通常分配试验在室温下进行，用涡旋振荡器(大约 3 分钟)或试管旋转仪(5 r/min，20～30 分钟)进行混合。当大量的成分以固体形式加入时推荐采用后一种混合方法。用吊桶式转头 2000*g* 离心 5 分钟使两相分离，标记好相体积并重复离心确保两相彻底分离。如果某一相体系已形成与第一次离心后体积比保持恒定，记录相体积，用移液管转移上层相并分析所要产品的浓度。如果感兴趣或有必要的话，同时分析粘性下层相中产物的浓度，靶蛋白的分配系数 K 可以通过上层相的活性(U/ml)除以下层相的活性(U/ml)获得。

从酿酒酵母（*S. cerevisiae*）中分离延胡索酸酶可以作为上述整个过程的例子。

从酿酒酵母分离延胡索酸酶

将酿酒酵母细胞悬浮于 100mmol/L 磷酸钾缓冲液中，pH7.5，获得 40%（w/v）的细

胞悬浮液，调节悬浮液的 pH 值，然后，细胞的破碎可以用连续操作的球磨搅拌器（Schütte and Kula 1990a）或由高压匀浆器（100MPa）（Schütte and Kula 1990b）球磨机连续处理两次来完成，细胞破碎后匀浆的 pH 值必须调节至 7.5。用标准方法测定酶的活性（U/ml）和蛋白的含量（mg/ml），并计算匀浆的比活性（U/mg）。

在实验室中一般处理的 10g 标准体系中，含有（以延胡索酸酶为例）：

50%	（w/w）	匀浆（40% w/v）	=	5.0g
17%	（w/w）	聚乙二醇（PEG1500）	=	1.7g
7%	（w/w）	磷酸钾（pH8.0）	=	0.7g
26%	（w/w）	去离子水	=	2.6g
100%			=	10.0g

为了计算一给定的水相体系中的总单位数（100%），有必要注意，5g 匀浆的体积一般为 4.7 或 4.8ml，而不是 5ml。

经过上述混合和离心后，从实验中应确定如下数据：

- 在两相中所要酶的浓度
- 两相中蛋白质的含量
- 上层相和下层相的体积
- 两相的 pH
- 两相中的总单位数和总毫克数
- 上层相中所要酶的产量，专一性和纯化常数

如果相体系的体积比不是最佳（2/3 上层相，1/3 下层相）或在上层相中所要酶的产量低于 90%，为了进一步优化可以改变下列因素：

- 匀浆的量
- PEG 1540 的量
- 磷酸钾的量
- 盐的 pH（K_2HPO_4 和 KH_2PO_4 的混合液）

原则上，只分析上层相就足够了，因为含有细胞碎片等的富含盐的下层相将被丢弃，而 PEG 富集的上层相中应含有所需要的酶。含有酶的一相不能直接应用于一般的柱层析技术，因为其粘度太高。因此，为了建立两相体系而引入酶液的 PEG 必须除去，有许多方法可以用来达到这个目的。一个简单的方法是像下面讨论的，在 PEG 富集的上层相中加入盐，以产生一个新的相体系，使所要的酶转移至盐相中。

3.4 用后续分配步骤进一步纯化

在第一步提取过程中，通过离心或分离器被分配至上层相中的蛋白可以用加入合适浓度的盐以形成第二个两相体系的方法而得到进一步纯化。这样，大部分的 PEG 和一部分盐（如果第一系统为 PEG/盐系统）得到了再利用。靶蛋白在这一步中为了从大量粘稠的 PEG 中分离，应转移到下层的盐富集相（例如，通过改变 pH 或加入少量的 NaCl）。为了分开两相，可在一简单的容器中静置 30～90 分钟即可获得明显分离的两

相。当需要进行多步分离时（Hustedt et al. 1985b），利用重力作用在合适的静置容器或混合器中可以毫不费力以任意规模进行连续分离。

为了将延胡索酸酶从 PEG 富集相转移至盐富集的下层相，可采用下列体系：

60%	(w/w)	上层相 I	=	6g
7%	(w/w)	磷酸钾盐混合物（pH7.0）	=	0.7g
0.5%	(w/w)	NaCl	=	0.05g
32.5%	(w/w)	去离子水	=	3.25g
100%			=	10.0g

为了进一步优化可以改变下列因素：

- 上层相的量
- 磷酸钾盐的量
- 盐混合液的 pH
- NaCl 的量
- 加入 PEG 10000

如前所述进行相的混合和分离后，对两相均需进行分析。K 值最小应该在 0.01 范围内，以期在下层盐富集相中获得高产量的延胡索酸酶，表 3.3 归纳了从酿酒酵母中提取延胡索酸酶的实验数据（10g 的规模）。经过两步液-液提取过程的流程见图 3.2。表 3.4 列出了一些蛋白的纯化效率。

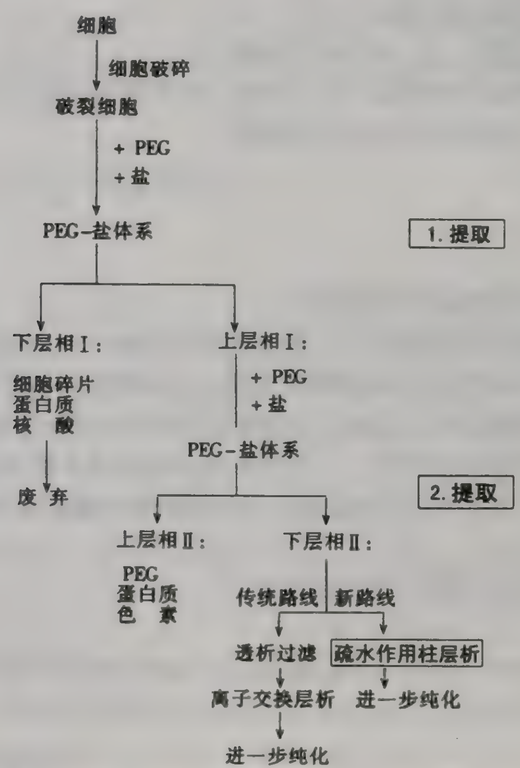


图 3.2　进一步层析纯化提取蛋白质的一般过程图解。

表 3.3 用一步或几步分配步骤部分纯化酶的例子

酶	来 源	分配步骤数（N）	总分离常数	总产量（%）
支链淀粉酶	*Klebsiella pneumoniae*	4	6.3	70
α-1，4-葡聚糖磷酸化酶	*Klebsiella pneumoniae*	2	2.5	81
延胡索酸酶	*Brevibacterium ammoniagenes*	3	8.8	70
天冬氨酸酶	*Escherichia coli*	3	23	68
葡萄糖脱氢酶	*Bacillus species*	3	33	83
亮氨酸脱氢酶	*Bacillus sphaericus*	2	7.7	97
甲酸脱氢酶	*Candida boidinii*	4	4.4	70
葡萄糖异构酶	*Streptomyes species*	1	2.5	86
β-葡糖苷酶	*Lactobacillus cellobiosus*	1	2.4	98
干扰素	人成纤维细胞	1	350	86

第一步分配步骤的目的往往是为了除去破碎的细胞（干扰素除外）。

表 3.4 用液-液提取法从酿酒酵母中初步纯化延胡索酸酶

步骤	体积	活性 (v/ml)	总活性 (U)	蛋白质 (mg/ml)	总蛋白质 (mg)	专一性活性 (U/mg)	产率 (%)	纯化 (倍数)
粗抽提物	4.8	14.6	70.1	39.2	188.2	0.37	100	1.0
1. 上层提取物	6.5	10.4	67.6	12.1	78.7	0.86	96.4	2.3
2. 下层提取物	4.9	12.0	58.8	8.9	43.6	1.35	83.9	3.6

3.5 水相两相体系的放大

大量酶的提取由于相系统的快速平衡、技术操作的简单性以及可获得市售的必须设备而变得简单易行。酶的提取回收可在 10g 至 1t 以上的相体系中进行。10g 体系中的各种组成可以按比例放大，在实验误差范围内，可以获得相同的结果，如从蜡状芽孢杆菌（Schütte et al. 1985）中纯化亮氨酸脱氢酶。

从蜡状芽孢杆菌中纯化亮氨酸脱氢酶

30kg 蜡状芽孢杆菌细胞用连续运转的工业搅拌磨打碎，再经 63℃热处理 10 分钟。为了提取蜡状芽孢杆菌匀浆，加入 PEG 1540 固体和磷酸钾盐固体（pH8.0 混合物），搅拌 1 小时，形成PEG/盐系统并确保分配达到平衡。整个提取体系由 18%（w/w）PEG 1540（25.2kg），7%（w/w）磷酸钾盐（9.8kg），70L 细胞匀浆和去离子水组成了 140kg（128L）的相体系。液-液分离采用盘状分离器（Westfalia separator model SAOH-205，Westfalia AG，Oelde，德国），速度 100 L/小时，在上层 PEG 相 I（86L）中有 98%的 L-亮氨酸脱氢酶，该相中无固体颗粒。酶的比活经过这一步后与细胞匀浆相比提高了 11 倍，比用传统离心方法报道的活性提高了 2.2 倍。

第二相体系最终体积为 172L，含有 86L 的上层相 I，11%（w/v）磷酸钾盐（pH7.0

混合物）和终浓度为 0.3mol/L 的 NaCl。搅拌 1 小时后，在静置容器中利用重力作用进行两相的分离，两相的完全分离需要 30 分钟。收集下层相后用 10mmol/L 磷酸缓冲液（pH7.5）进行透析，然后，按表 3.5（Schütte et al. 1985）方法进行酶的进一步纯化。

表 3.5 L-亮氨酸脱氢酶的纯化

步骤	体积 (L)	蛋白 (g)	总活性 (v. 10^{-3})	比活 (U/mg)	产量 (%)	纯化 (倍数)
初提	70	723	434	0.6	100	1.0
热处理	70	145	421	2.9	97	4.8
上层相Ⅰ	86	61	412	6.8	95	11.3
下层相Ⅱ	99	40	373	9.3	86	15.5
透析	2.4	22	360	16	83	26.7
DEAE-Sephacell	4.7	13	308	24	71	40
Sephacryl S-200	0.48	6.3	260	41	60	68.3
Sepharose 4B	1.4	3.6	208	57	48	95

氧化去氨基化分析。

Hart 等（1994）报道了从大肠杆菌中原位大量分离周质人胰岛素样生长因子Ⅰ(IGF-Ⅰ)的方法，IGF-Ⅰ当带有内源的分泌信号序列在大肠杆菌中表达时，其产物以折叠的和聚合体两种形式存在于发酵培养基和细胞周质中。由于其存在形式和位置的不均一性，采用典型的折射回收战略（refractile body recovery strategy）只能获得低收率的 IGF-Ⅰ。为了提高收率，采用了当细胞还在培养基中时即将 IGF-1 溶解并提取出来。这一方法称为原位溶解法，包括加入离液剂（终浓度 2 mol/L 尿素）和还原剂（终浓度为 10 mmol/L 二硫苏糖醇）至碱性的发酵培养基中，从分离的上清液中可获得 90% 回收率的 IGF-Ⅰ。在用水两相提取过程将非天然的可溶性 IGF-Ⅰ和大量生物固体分配至分离两液相过程中，加入多聚物（PEG 8000）和盐（硫酸钠）至可溶的混合物中，在上层相中获得 90% 回收率的可溶性 IGF-Ⅰ，水溶解和水相提取过程在 10～1000L 的范围内具有重复性，在分离的上层相中最终可获得 70% 回收率的 IGF-Ⅰ。总之，原位溶解和水两相分离体系提供了一种在发酵过程中提取以不同形式积累的重组蛋白的新的高产量的分离方法。

3.6 连续串联提取

表 3.3 总结了已进行的由几个连续的、单级提取相结合的批量提取纯化过程。然而，Hutstedt 等（1985b，1987）设计了一种可连续串联提取的装置。进行大量蛋白质提取回收的水相体系过程需两个技术操作：①相成分的混合及其后在相中的分散；②相的分离。两者都容易连续进行。用连续串联提取法纯化酶的流程见图 3.3。贮存的 PEG 和盐溶液注入到细胞匀浆中，混合物经过第一平衡混合器后通过第一分离器，流出的含有细胞碎片和大部分杂蛋白的下层相被丢弃。含有产品的上层相Ⅰ收集至一容器中，在加入盐溶液至流动相以形成第二个相分离体系前，从该容器中用泵使上层相Ⅰ流过第二平

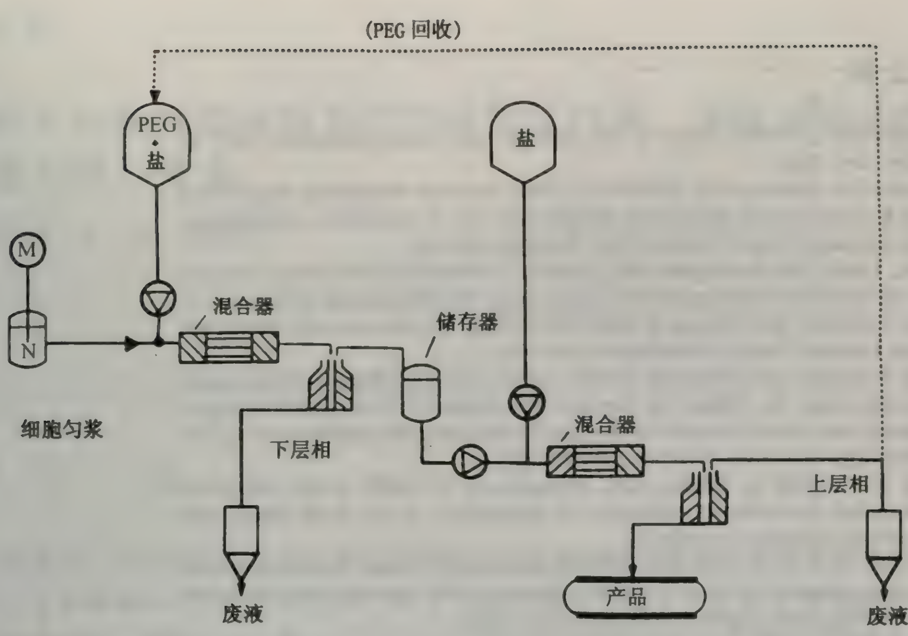


图 3.3 蛋白质纯化的连续串联提取流程图。(引自 Hustedt et al. 1985b)

衡器，然后在第二分离器中分离。流出的下层相（盐富集相）含有产品，而 PEG 富集的上层相可以再循环或丢弃。这样一个装置用一台个人电脑（Westfalia AG，Oelde，FRG）进行连续操作控制，一天（8 小时）可以处理 200kg 的生物多聚物（Hustedt et al. 1987）。Kroner 等（1984）对大量酶回收的经济性以及从水相中用液体提取法提高回收率等进行了讨论，并与其他方法进行了比较。

3.7 总　　结

水两相体系对于分离许多水相容性物质（从肽到细胞）非常有效。分离的选择性一般随着分离分子或颗粒大小而增加。分配及分离能力受一些因素影响。水两相体系非常适宜大量纯化生物物质如酶以及其他生物活性蛋白。这一新技术的特征为：

• 高容量性
• 在任何规模的易操作性
• 方便及精确的放大
• 产物的高回收率
• 低投资消耗
• 连续处理的高潜在力
• 对化学品的相对大需求

此外，在后续的柱层析分离中没有观察到对提取物所造成的不良影响（图 3.2）。

（沈国祥 译　陈常庆 校）

参考文献

Albertsson PA (1986)Partition of cell particles and macromolecules; 2nd ed. Wiley, New York

Albertsson PA, Johansson G, Tjerneld F (1990) Aqueous two-phase separations. In: J.A. Asenjo (ed); Bioprocess technology Vol. 9. Separation processes in biotechnology. Marcel Dekker, New York, pp 287–327

Hart RA, Lester PM, Reifsnyder DH, Ogez JR, Builder SE (1994) Large scale, in situ isolation of periplasmic IGF-I from E.coli. Bio/Technology 12:1113–1117

Hustedt H, Kroner KH, Menge U, Kula MR (1985a) Protein recovery using two-phase systems. Trends Biotechnol. 3:139–144

Hustedt H, Kroner KH, Kula MR (1985b) Applications of phase partitioning in biotechnology. In: Walter H, Brooks DE, Fischer D (eds) Partitioning in aqueous two-phase systems: theory, methods, uses, and applications to biotechnology. Academic, Orlando, pp 529–582

Hustedt H, Börner B, Kroner, KH, Papamichael N (1987) Fully automated continuous crosscurrent extraction of enzymes in a two stage plant. Biotechnology Techniques 1:49–54

Kroner KH, Hustedt H, Kula MR (1982) Evaluation of crude dextran as phase-forming polymer for the extraction of enzymes in aqueous two-phase systems in large scale. Biotech Bioeng 24:1015–1045

Kroner KH, HustedtH, Kula MR (1984) Extractive enzyme recovery: economic considerations. Process Biochemistry 19:170–179

Kula MR, Kroner KH, Hustedt H (1982) Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. In: A.Fiechter (ed) Advances in biochemical engineering, Vol. 24, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp 73–118

Schütte H, Hummel W, Tsai H, Kula MR (1985) L-leucine dehydrogenase from Bacillus cereus: Production, large-scale purification and protein characterization. Microbiol.Biotechnol. 22: 306–317

Schütte,H, Kula MR (1990a) Bead mill disruption. In: JA Asenjo (ed) Bioprocess technology, Vol.9. Separation processes in biotechnology Marcel Dekker, New York, pp 107–141

Schütte H, Kula MR (1990b) Review: pilot- and process-scale techniques for cell disruption. Biotechnol. Appl. Biochem12: 599–620

Walter H, Brooks DE, Fisher D (1985) Partitioning in aqueous two-phase systems: Theory, methods, uses and applications to biotechnology. Academic Press, Orlando,

Schütte,H, Kula MR (1990a) Bead mill disruption. In: JA Asenjo (ed) Bioprocess technology, Vol.9. Separation processes in biotechnology Marcel Dekker, New York, pp 107–141

Schütte H, Kula MR (1990b) Review: pilot- and process-scale techniques for cell disruption. Biotechnol. Appl. Biochem12: 599–620

Walter H, Brooks DE, Fisher D (1985) Partitioning in aqueous two-phase systems: Theory, methods, uses and applications to biotechnology. Academic Press, Orlando,

第4章

采用非孔状硅胶珠填充的短柱作蛋白质、多肽和氨基酸的快速 HPLC 分离

F. Godt, R. M. Kamp

4.1 引　　言

多年来，由于硅胶的许多独特性质而使基于硅胶的层析支持物的柱层析在 HPLC 分析中占有重要地位。技术上的发展产生了直径仅为 1.5μm 的无孔硅胶填充颗粒，硅胶的无孔性消除了颗粒内的扩散，可具有的自由表面使得蛋白质和介质之间的相互作用和物质转移不受到阻碍，从而显著地改善了分析的灵敏度。由于短柱具有非常光滑的内表面、不锈钢网和纤维滤膜夹心，加上高质量的装柱技术，缩短了分析时间并减少了溶剂的消耗。快速分离也缩短了与溶剂和介质接触的时间，这些接触往往会导致生物分子活性的丧失或三级结构的破坏。

小颗粒载体改善了 HPLC 的分离效果，用 1.5μm 硅胶颗粒填充的 30～33mm 柱子具有与用 5μm 材料填充的 25cm 柱子相同的理论塔板数(代表层析柱的分离效率)，而分离时间则可以从几个小时缩短到几分钟。尖锐的峰形提高了检测极限，使得痕量的杂质也能被检测。

用有孔的硅胶进行生物分子的经典分离往往会引起非专一性的吸附，而在下一轮分离中这些被吸附的分子被洗脱。无孔硅胶由于无孔性，表面不会吸附物质，被分离物质可以达到100%的回收率。无孔层析柱已被用来快速分离大的生物分子，如蛋白质(Unger 1986; Janzen 1987)。当层析柱的温度升高至80℃，分离过程甚至可缩短为数秒(Kalghatgi 1987)。

无孔介质也被用于肽图（Kalghatgi 1987，1989；Jilge 1987），下面将以细胞色素 c 的胰蛋白酶酶解肽段为例，对此进行讨论。

无孔层析柱在小分子化合物如氨基酸分离上的应用是在 1993 年（Stromer 1993）首次被研究。使用含有离子对的水缓冲液加入含离子对的试剂以及甲醇作为有机改性剂，在 7 分钟内使得 14 种氨基酸得到了分离，为了使检测灵敏度达到低的 pmol 水平，在进样前氨基酸用 o-邻苯二甲醛进行衍生化。

4.2 洗脱剂

4.2.1 水性缓冲液

分离蛋白质、多肽和氨基酸可以采用不同的缓冲液，如 0.1%的三氟乙酸（TFA）、醋

酸铵、甲酸铵或磷酸钠。分离蛋白质和多肽时，为了便于进一步的研究，优先采用低盐浓度和具有挥发性的缓冲液，通常 0.1%TFA 在进行反相柱层析时即足以使样品离子化。

制备水性洗脱剂

1) 使用去离子化并经过超滤处理的水。
2) 在洁净的玻璃器皿中制备流动相。
3) 对于 TFA 缓冲液使用序列测定级或经三次蒸馏的 TFA。
4) 含盐的缓冲液每升加入 1mg 叠氮化钠以抑制微生物的生长。
5) 用 0.45μm 滤膜过滤缓冲液。
6) 用超声波或更好采用连续脱气系统如 ERC(Alteglofsheim,德国)进行水性缓冲液的脱气。
7) 每周制备新的水性缓冲液。

4.2.2 有机改性剂

在用反相系统分离蛋白质、多肽和氨基酸时可以使用不同溶剂，所选用的有机改性剂要保证在使用波长处只有微弱的吸收。分离大的疏水性蛋白时，丙醇是一种比乙氰或甲醇更强的洗脱剂，而小分子多肽用乙氰即可达到令人满意的分离效果。氨基酸通常用水性缓冲液和洗脱能力低于丙醇和乙氰的甲醇进行梯度洗脱。

有机溶剂的制备

1) 只能采用 HPLC 级的有机溶剂。
2) 只能使用洁净和干燥的玻璃器皿。
3) 加入 10%的水性缓冲液以避免基线的上升。
4) 用超声波或最好使用连续脱气系统如 ERC（Alteglofsheim 德国）去除气体。

4.2.3 样品制备

将蛋白质或多肽溶解在起始缓冲液中制备成浓度为 1 ~ 100pmol/2 ~ 4μl 的溶液，该溶液中不能含有不溶性颗粒。稀释的样品应采用冷冻干燥系统进行浓缩，最好带有离心，而且不要完全冻干。为了防止溶解干样品时遇到的问题，尽可能取酶解消化液或经预分离后的样品直接进样；为了达到有足够分辨率，进样体积要尽量小。进样阀的样品室的室体积应为 2 ~ 4μl，使用甲醇清洗过的精密注射器，进样时避免带入气泡。对于自动进样器，使用微量样品管以确保样品溶液是在管底。

4.3 蛋白质和多肽的分离

4.3.1 材料

HPLC 系统

— 两台 HPLC 泵（型号 510；Waters Co.，Milford，MA）

— 具有 4μl 样品室的进样阀（Rheodyne，Cotati，CA）
— 混合体积为 300μl 的梯度混合仪（BioRad，Hercules，CA）
— 自制的柱烘箱
— 光二极管矩阵检测器（型号 996，Waters Co.，Milford，MA），Millenium 2.0 软件（Waters Co.，Milford，MA）
— 填充有 1.5μm 无孔硅胶颗粒（Micra Scientific，Northbrook，IL，USA）的 NPS 1.5μm 层析柱（尺寸：33mm × 4mm）
— Kovasil MS-H 1.5μm 层析柱（尺寸：30mm × 4mm；由 Dr. Herbert Funke 赠送，Läutenring 29，85235 Pfaffenhofen，德国）
— 含有 7μm 和 3μm 不锈钢滤网的预柱（Knauer GmbH，Berlin，德国）

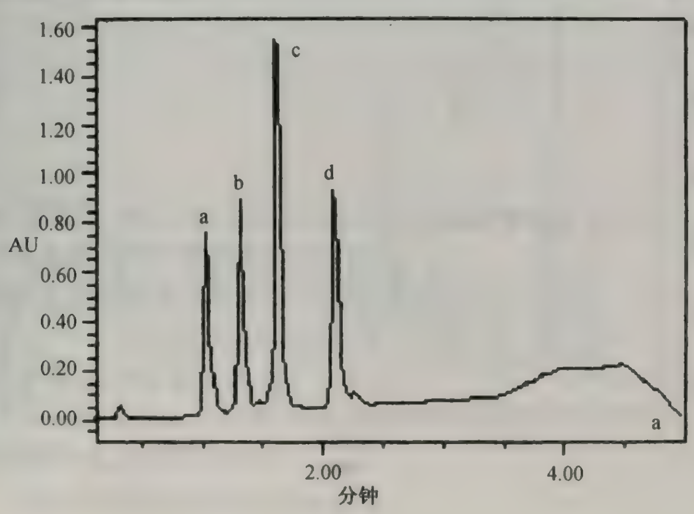
试剂

— 缓冲液 A：0.1%TFA 水溶液〔用 0.45μm 滤膜过滤（Schleicher and Schuell，Dassel，德国）和脱气连续装置脱气（ERC 型号 3112；ERC，Alteglofsheim，德国）〕。
— 缓冲液 B：0.1%TFA 的乙氰溶液，如缓冲液 A 一样进行过滤、脱气处理。

4.3.2 蛋白质和多肽的逐步柱层析

如果是第一次用此系统分离一未知混合样品，按如下步骤进行：

1）平衡层析柱 5 分钟。
2）**在未上样**、室温、检测波长 220nm、流速 1ml/分钟的条件下，缓冲液梯度由 0%B 到 100%B 线性洗脱运行 30 分钟。
3）如果运行结果显示稳定的基线，将 1～20μg 蛋白质或多肽溶在 2～4μl HPLC 起始缓冲液 A 中，上样。
4）通过改变梯度斜率和柱温，优化梯度达到所有成分能完全分离。
5）收集各峰作进一步研究。



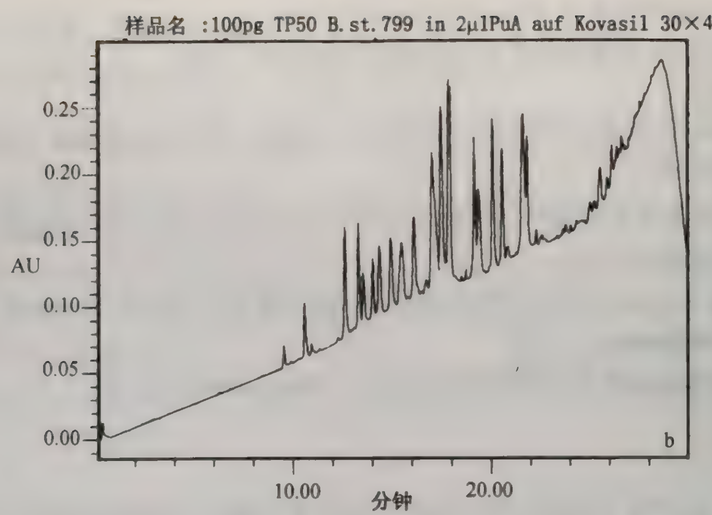
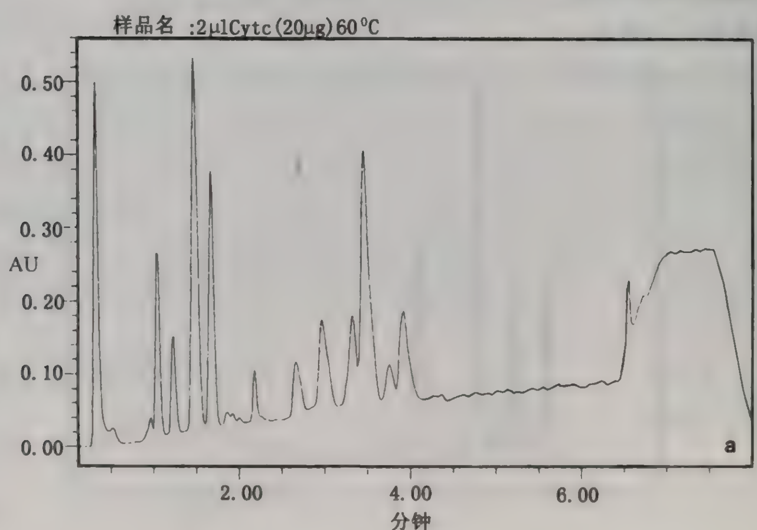


图 4.1 **a**.用 33mm×4mm Micra NPS 1.5μm 层析柱分离 4 种蛋白。缓冲液 B(见正文)的梯度为:在 3 分钟内由 20%升至 60%,再在 0.5 分钟内由 60%升至 100%,并维持 0.5 分钟,然后在 0.5 分钟内降至 20%。再在 2μl 起始缓冲液中溶解 a. 核糖核酸酶、b. 细胞色素 c、c. 溶菌酶和 d. β-乳球蛋白各 10μg。**b**. 用 30mm×4mm Kovasil 1.5μm 层析柱分离 *B. stearothermophiles* 799 50S 核糖体亚基的各蛋白。缓冲液 B 的梯度为:在 25 分钟内由 10%升至 50%,再在 2 分钟内由 50%升至 80%,并在 80%浓度维持 1 分钟,然后在 1 分钟内由 80%降至 10%,并在 10%缓冲液 B 中继续维持 1 分钟。100μg 总蛋白溶解在总共 2μl 的起始缓冲液中,所有分离均在 60℃下进行并用 220nm 波长检测。

图 4.1 显示了 4 种蛋白质、核酸酶、细胞色素 c、溶菌酶和 β-乳球蛋白的分离。图 4.2 为两个不同柱子对细胞色素 c 的胰蛋白酶酶解肽段分离结果。



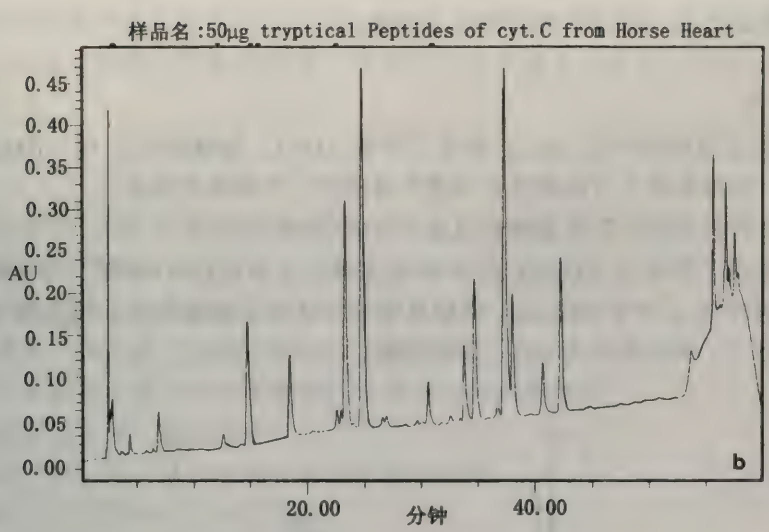


图 4.2 两种不同层析柱对细胞色素 c 的胰蛋白酶酶解肽段的分离比较。细胞色素 c 由马心脏提取后在室温下用胰蛋白酶消化 4 小时。**a**. 短的 Kovasil MS-H 柱的分离：直接进样 20μg 样品。缓冲液 B 的梯度为:6 分钟内浓度由 10%升至 30%,再在 0.5 分钟内由 30%升至 80%,并维持 0.5 分钟,然后在 0.5 分钟内由 80%降至 10%,并再此浓度维持 0.5 分钟。**b**. 250mm×4.6mm Vydac RP, C18 柱(填充颗粒直径 5μm,由 Knauer, Berlin 填充)的分离;上样量为 50μg。缓冲液 B 的梯度变化为:50 分钟内由 5%升至 40%,再在 2 分钟内由 40%升至 80%,并在此浓度维持 3 分钟,然后在 2 分钟内由 80%降至 5%,并在此浓度再维持 3 分钟。两次分离的流速均为 1ml/分钟,柱温 60℃,检测波长为 220nm。

4.4 氨基酸的分离

对于 HPLC 设备的要求和上柱前的衍生化过程,包括洗脱剂和试剂的详细叙述,请参见第 15 章。

4.4.1 设备

材料

— 30mm×4mm 层析柱,用 1.5μm Eurospher C18 无孔硅胶颗粒填充(Knauer, Berlin, 德国),其他公司的无孔填充颗粒层析柱也可以使用
— 具有柱前衍生化装置的自动进样器 (Spark Holland, Ve Emmen, The Netherlands)

4.4.2 氨基酸的逐步柱层析分离

1) 用起始缓冲液平衡层析柱 5 分钟。
2) 不进样，以空柱照前述方法进行梯度洗脱。

3）当基线稳定之后，再次平衡层析柱 5 分钟。

样品制备

4）在 10μl 样品缓冲液中用 10μl o-邻苯二甲醛（OPA）溶液衍生化 10~100pmol 氨基酸混合物，室温保温 1 分钟后用自动进样器进样，开始梯度洗脱。

5）将各峰进行积分并计算氨基酸的组成（见第 15 章）。

图 4.3 显示了每种为 100pmol 的 14 种氨基酸，上柱前经 o-邻苯二甲醛衍生化后的分离图谱。缓冲液 A 含有 30mmol/L 磷酸氢钠和 1ml 四丁基氯化铵，用去离子水调整体积至 1L，pH5.2。缓冲液 B 为 HPLC 级的甲醇。

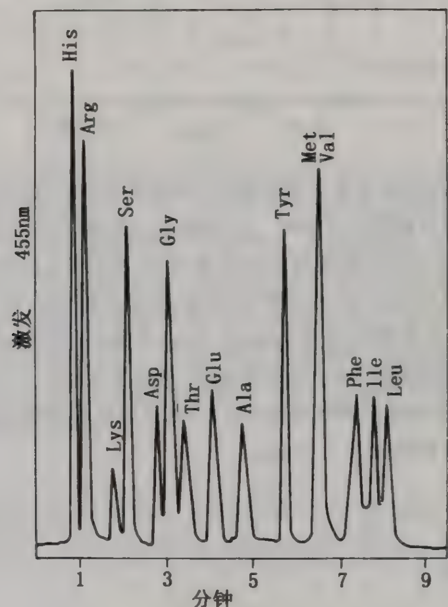


图 4.3　7 分钟内 14 种含量各为 100pmol 的氨基酸上柱前经 o-邻苯二甲醛衍生化后的分离图谱。流速为 1.5ml/分钟，使用 Shimadzu（Kyoto，Japan）RF-551 型荧光检测器，激发波长 340nm，淬灭波长为 455nm。缓冲液组成见正文。缓冲液 B 的组成在 4.5 分钟由 2%升至 10%；再在 0.5 分钟内由 10%升至 20%，然后在 3 分钟内由 20%升至 30%，最后在 2 分钟内降至 2%，柱温为 30℃。

4.5　问题及处理

使用无孔硅胶颗粒作为填充材料的短柱时，流经途径的总体积、保留体积、流经的孔的体积和进样体积应尽可能的小。通过减少整个流经途径的体积可以增加分辨率。当流速为 1ml/分钟或 1.5 ml/分钟时，由于柱填充物的孔径为 1.5μm，柱压通常很高，这时可以用增加柱温的方法来解决。高的温度也可以增加分辨率，从而满足某些分离的要求。为了保护柱子，在此极力建议采用经过滤处理的缓冲液、预柱及小的流动路径体

积。当水性缓冲液中的盐浓度超过 10 mmol/L 时，由于盐在泵头处的结晶可能导致很小的渗漏，用水连续经流出孔清洗泵头，或使用后清洗整个系统可以预防这一现象的发生。

柱的保存

- 使用高纯度的 HPLC 级溶剂和内标物及预柱。
- 洗柱前用 80% 甲醇及其后用缓冲液洗柱 15 分钟。
- 在不上样前用梯度洗脱法检查柱的清洁度。
- 用标准蛋白、多肽或氨基酸检测柱的分离效率。
- 为了防止硅胶的水解，严禁使用 pH < 2 或 pH > 8 的缓冲液。
- 如果柱后压力过高，更换预柱。
- 如果出现“鬼”峰，通过下列方法进行柱的再生。
  — 用水洗柱直至获得稳定的基线。
  — 用甲醇替代水清洗至获得稳定的基线。
  — 再用氯仿替代甲醇将所有杂质洗出。
  — 用甲醇清洗。
  — 用起始水性缓冲液平衡层析柱。
  —用标准混合物检测分辨率。
- 将柱保存于 80% 的甲醇中。

4.6 评　议

无孔硅胶颗粒提高了柱层析的效率，使用这种微小球状颗粒可以快速分离不同大小的生物分子如蛋白质、多肽和氨基酸。此外，这些形成尖锐洗脱峰的被分离生物活性分子的洗脱体积往往只有几微升到 1 ml，这样就避免了许多浓缩步骤，减少了暴露于极端条件的机会。尽管通过流动孔之间的样品量减少了，但检测的灵敏度高于用有孔硅胶柱的灵敏度。用无孔硅胶颗粒填充的柱子可以耐受 300bar 的压力，取决于所用的柱和流速。新的过滤技术已大大减少了由于在柱的流动路径中产生堵塞而引起的问题。

（沈国祥 译　陈常庆 校）

参 考 文 献

Janzen R, Unger KK, Giesche H, Kinkel JN, Hearn MTW (1987) Performance on nonporous monodisperse 1.5μm bonded silicas in the separation of proteins by hydrophobic interaction chromatography. J Chromat 397: 91–97

Jilge G, Janzen R, Giesche H, Unger KK, Kinkel JN, Hearn MTW (1987) Retention and selectivity of proteins and peptides an gradient elution on nonporous monodisperse 1.5μm reversed phase silicas. J Chromat 397: 71–80

Kalghatgi K, Horvath C (1987) Rapid analysis of proteins and peptides by reverse-phase chromatography. J Chromat 398: 335–339

Kalghatgi K, Horvath C (1989)In: Wittmann-Liebold B (ed) Rapid peptide mapping and protein analysis by HPLC. Methods in protein sequence

analysis. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp 248–255
Unger KK, Jilge G, Kinkel JN, Hearn MTW (1986) Evaluation of advanced silica particles for the separation of biomolecules by high performance liquid chromatography. J Chromat 359: 61–72
Unger KK, Jilge G, Janzen R, Giesche H, Kinkel JN (1986) Nonporous microparticulate support in high performance liquid chromatography (HPLC) of biopolymers: concepts, realizations and prospects. Chromatographia, 22: 379–380
Stromer D, Gottschall K, Kamp RM, (1993) Schnelle Trennung von Biomolekülen. BioTec 4: 32–37

第二部分
多肽的分离

第5章

蛋白质的酶学和化学降解

R. Kraft

5.1 背　　景

蛋白质鉴定的主要任务是①得到足够的氨基酸序列以确定一个纯化的蛋白或者凝胶上的一个有意义的点或带；②通过 DNA 重组技术构建推导一级结构的寡核苷酸探针；③制备抗多肽的抗体。今天，如果多肽的 N 末端未被封闭，用不到 10pmol 的量即可常规地得到氨基酸序列信息（Kraft et al. 1995）。不幸的是，真核细胞内 80%可溶蛋白由于翻译后修饰的结果，其 N 末端 NH_2 基都被封闭，因而难以进行 Edman 降解（Kraft et al. 1988；Bonaventura et al. 1994）；另外，微量蛋白的分离过程也可能导致氨基酸末端的人为封闭。因此，氨基酸序列的数据，只有在去除这些基团之后，或将该蛋白从内部切断，然后对从产生的混合物分离得到的各个肽段进行测序才能得到。除此之外，对降解蛋白各个肽段的测序结果，能对该蛋白有更精确的鉴定。从而为随后的分子克隆方案提供更多可能的选择，而且，某些蛋白序列数据，至少对于说明 DNA 顺序数据，确定蛋白质的修饰位点（酰化、甲基化、糖基化、磷酰化以及信号肽或前序列的切割位点等），以及对于蛋白质晶体结构的解释是很必要的。总之，蛋白质化学迫切需要有高效、灵敏而且可靠的方法以用于：① 化学降解或酶降解纯化蛋白；② 从混合物中分离所产生的内部切割的肽段；③ 分析鉴定所得到各个肽段（包括氨基酸组成分析、自动测序或质谱分析）。

5.2 原理和应用

专一化学试剂和具有不同水解专一性蛋白酶（Flannery et al. 1989）的应用有可能得到重叠序列的肽段，从而推断出长的氨基酸序列。可以用蛋白酶对多肽底物进行限制性酶解，因而，它对于获得有关高级结构的数据是一个很有用的工具，可得到不易被蛋白酶作用的核心区中裸露环区的信息或各结构域之间的多肽连接区的信息。（Price and Johnson 1989；Misselwitz et al. 1992）。此外，蛋白酶也是膜蛋白的有用的拓扑学探针（Pratt 1989；Chernogolov et al. 1994），它们提供了快速和有效的制备高产率膜蛋白可溶部分的方法（Butler 1989）。最后，正如最近对于完整的核糖体亚基所发现的，有效的蛋白酶酶解可以用来鉴定蛋白复合体表面上的氨基酸和多肽区（Kruft and Wittmann-Liebold 1991）。尽管限制性降解对于许多研究项目都有关系，本章中介绍了对变性蛋白的更广

泛的酶切，其目的是为了获得足够多的高产率多肽从而可能用于一级结构的分析工作。

降解方式的选择主要取决于所需要片段的数量和大小（Matsudaira 1993），在低含量残基（如 Met，Asp-Pro 或 Trp）的位置上进行化学降解时，先走 SDS-PAGE（Tricine-胶，Schägger and von Jagow 1987），然后将单一肽的带电转到惰性膜上（聚二乙烯，PVDF），可能是防止微量蛋白样品损失的最佳选择方法，相反地，小量样品在高出现频率残基（例如 Lys 或 Arg）的位置上进行蛋白酶解后的产物则最好是采用细的反相 HPLC 柱进行分离。

5.3 化学和酶解试剂

最常用的化学方法是用 CNBr 的 70%甲酸或三氟乙酸溶液在甲硫氨酸的羧端处切断肽链，这个方法的主要优点是可很简单地通过微量真空离心机浓缩去除挥发物和副产物，并且，如果将存在于凝胶中或固定在膜上的蛋白进行原位降解时，则采用 70%甲酸这种很好的多肽溶剂，很容易将片段切出或从凝胶或 PVDF 膜上抽提至上清中。如果发现对所转移蛋白的肽的回收率太低，例如，非常长的或疏水的肽段可能保持在载体上，则最好是将在 PVDF 膜上的片段用蛋白酶再酶解一次。

总结文献中已有的酶解应用，虽然胰蛋白酶是在蛋白质原位降解中选用最多的酶。但胰凝乳蛋白酶、蛋白内切酶、Lys-C 和 Asp-N 也同样有效（Fernandez et al. 1992）。多种蛋白酶的有效使用可以改善获得大小合适肽段的机会，15 个氨基酸左右的肽段对在克隆中所用的寡核苷酸探针设计是最合适的。

有关蛋白质固定在载体上后的结构变化（疏水力，离子相互作用），从而导致底物/蛋白酶相互作用或者反应动力学的问题，目前还知之甚少。酶解反应一般是在 37℃下保温至少 15 小时，而且往往是在酶解缓冲液中加入有限量的去垢剂、变性剂或有机溶剂。最近的研究表明（Fernandez et al. 1994），并不需要用封闭试剂（例如 PVP-40）进行分别的预处理以防止膜对酶的吸附。酶切缓冲液中常含有的氧化的 Triton X-100，它是作为抑制肽的有效的增溶试剂加在酶解缓冲液中，也可以防止酶对膜的结合。对于低于微克的样品，必须采用最大酶浓度，在溶液中对变性蛋白酶解或在天然状态下的有限酶解反应，酶与底物的比一般是采用 1/20 到 1/100，但对于固定化的底物来说，推荐的比率为 1/5 至 1/20。对于后一种情况，载体的量应保持尽可能地少。

表 5.1 所列的降解方法已经证明是非常有用的。当然，许多其他的试剂和方法对多肽的降解也是可以选用的，但表 5.1 中的方法则在很多情况下都是一个很好的选择。

表 5.1　降解方法

降解方式	降解专一	参考文献
化学降解		
溴化氰	甲硫氨酸的羧基端（但对 Met-Thr 和 Met-Ser 的产率较低，而对甲硫氨酸的砜或亚砜则完全不降解）	Aitken et al. 1989[a] Jahnen et al. 1990[b] Bommer et al. 1991[b] Stone and Williams 1993[c]

续表

降解方式	降解专一	参考文献
BNPS-甲基吲哚	色氨酸的羧基端	Aitken et al. 1989[a]
稀酸	天冬氨酸的两侧，极少作用于天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺	Aitken et al. 1989[a] Vanfleteren et al. 1992[b]
甲酸（70%）	最适于天冬氨酸-脯氨酸键	Misselwitz et al. 1992[a] Sonderegger et al. 1982[b]
羟胺	天冬酰胺-甘氨酸键	Aitken et al. 1989[a] Strydow and Kandror et al. 1995[c]
酶法降解		
胰蛋白酶	赖氨酸、精氨酸的羧基端（赖氨酰-脯氨酸，精氨酸-脯氨酸例外，酶解较少）	Rosenfeld et al. 1992[b] Fernandez et al. 1994[c]
内肽酶 Lys-C	赖氨酸（和 S-氨乙基半胱氨酸）的羧端	Jenö et al. 1995[b] Hellman et al. 1995[b] Fernandez et al. 1994[c]
内肽酶 Arg-C	精氨酸的羧基端	Fernandez et al. 1994[c]
内肽酶 Glu-C （蛋白酶 V8）	谷氨酸的羧基端 （碳酸氢铵 pH7.8，乙酸铵 pH4.0，另外在 pH7.8 的磷酸缓冲液中在门冬氨酸切断）	Sorensen et al. 1991a Jenö et al. 1995[b] Fernandez et al. 1994[c]
内肽酶 Asp-N	天冬氨酸和氧化蛋白中的氨基末端	Aitken et al. 1989[a] Jenö et al. 1995[b]
胰凝乳蛋白酶	最适位点是苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和亮氨酸的羧基端	Aitken et al. 1989[a]
嗜热菌蛋白酶	最适位点是疏水残基（亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、色氨酸）的羧基端	Aitken et al. 1989[a]

a. 溶液中；b. 凝胶中；c. 在支持介质（载体）中

5.4 方　法

5.4.1 样品制备

所有用于顺序分析的多肽必须去盐和去除其他干扰测序的成分，对于通过 HPLC 或 FPLC 纯化得来的毫克量的蛋白，可以通过透析、凝胶过滤及冷冻干燥或超滤的方法来相对容易地做到这一点。然而，微克量的蛋白很难操作，由于特别易吸附而损失，对于分离那些亚微克量的蛋白，可能的最好解决办法就是单双或双向的聚丙烯酰胺凝胶电泳。有几种方法可以从 SDS-PAGE 分离的蛋白中得到其内部顺序的数据：一种方法是将 SDS 胶上电洗脱下来的样品再进行酶解（不幸的是，对于那些只有皮摩尔量的样品，往往只能得到很低的总产率），另一种可供选择的方法是将样品在胶内酶解（Rosenfeld et al. 1992），或将样品转移到膜上后再酶解。对于降解固定在胶或膜上的蛋白的具体的实验细节可参见第 7 章和第 8 章。

通常情况下，蛋白在酶解之前需要变性和二硫键的拆开，这个步骤如果要在电泳前的 SDS 样品缓冲液中进行还原和烷基化反应（Jenö et al. 1995）或直接在序列仪的膜载

体上进行原位反应(Ploug et al. 1992),将不会或很少导致样品的损失。由于随后的酶解和多肽的提取,这些过程需要至少10倍可用于直接N端测序时蛋白的量作为起始的样品。

5.4.2. 溴化氰裂解

正如前文所述，对于甲硫氨酸残基，溴化氰是最常使用的化学裂解方法，裂解以高产率发生于甲硫氨酸残基的羧基端一边。由于甲硫氨酸在蛋白中出现的频率相对很少(平均100个氨基酸出现2个)，通常几个大肽片段适合于电泳分离，反应通常在70℃甲酸(或70%三氟乙酸，特别适于甲硫氨酸-丝氨酸和甲硫氨酸-苏氨酸键)，在室温反应24～48小时，大致上CNBr的量是甲硫氨酸残基的100倍。在溴化氰裂解之前，建议先还原蛋白，因为在分离过程中甲硫氨酸残基上的硫会被氧化成砜和亚砜，这些被氧化的残基将不为溴化氰所裂解，由于溴化氰裂解反应的结果是，所有甲硫氨酸残基都被变成高丝氨酸或高丝氨酸内酯。因此，只有那些来自COOH-末端的肽不是以高丝氨酸残基结尾的。

1) 准备70%甲酸溶液，并用氮气去除溶液中的氧气。
2) 溶解10μg冷冻干燥的蛋白在90μl用通过氮气的甲酸中。
3) 溶解大约1mg溴化氰在200 μl 70%甲酸中。
   注意：溴化氰晶体须无色和干燥，操作须在通风橱内进行，因为它具有毒性且具挥发性。
4) 将10μl新制备好的溴化氰/甲酸溶液加入到蛋白溶液中。
5) 将混合物在黑暗中并在氮气保护下，室温反应24小时。
6) 加入5～10倍体积的Mili-Q水，并在Speed Vac中真空浓缩去除多余的试剂。
   注意：在冷冻干燥中取去冷瓶时千万小心挥发的有毒物质溴化氰。
7) 重新溶解经冷冻干燥的溴化氰裂解片段入电泳缓冲液，进行SDS-PAGE或将此多肽片段溶解在溶液中（0.1%三氟乙酸/水）直接注射到反相HPLC柱中。

5.4.3 部分酸水解

由于部分酸水解缺乏专一性，所以它不是一个十分常用的方法，但这个降解方法对于那些用其他降解过程失败时，特别对于那些溶解度有限的蛋白还是十分有用的。实际上，一些氨基酸对于一些稀酸是十分敏感的，最敏感的是Asp-Pro键（平均频率是每400个氨基酸一个键），在天冬氨酸和另外一些残基（例如：天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸）处也有发生，因此降解很难有统一的模式，它很大程度依赖于蛋白的特性和所用的条件（酸的浓度、温度和时间）。必须注意的是：蛋白对于强酸的处理会引起副反应，例如：酰胺基团的水解、色氨酸的部分破坏和N末端谷氨酰胺残基的环化。

1) 将蛋白加入到含有稀酸的玻璃安瓿中（0.2%盐酸、2%甲酸、2%醋酸或0.1%三氟乙酸），对于难溶解的蛋白，可将蛋白溶解于相对较浓的甲酸，然后稀释。
2) 经氮气洗涤后真空密封安瓿，并在110℃，保持2小时。

3) 打开安瓿瓶在 Speed Val 中真空干燥，因为所用试剂都是具挥发性，所以不需经过脱盐，就可将混合物直接通过 HPLC 或 PAGE 来分离。

注意：当降解特殊的天冬氨酸-脯氨酸键时，70%甲酸 40℃反应 46 小时即可成功，降解反应可以用水稀释(1 : 20 v/v)来终止，并将多肽样品冷冻干燥。

5.4.4 胰蛋白酶、Lys-C 和 Arg-C

经这些酶降解产生的片段特别适于在数据库中进行序列分析，是因为它们有非常高的专一的切割位点，只获得羧基端为碱性氨基酸的肽段。为了使底物能完全消化，底物必须先进行变性，例如：热变性或加入高离解度的盐（盐酸胍或尿素）在降解缓冲液中，或加入还原性的烷化剂（蛋白酶在中等强度的变性条件下仍保持活性）。

1) 为已变性的蛋白溶解于 0.05~0.1mol/L 的 N-乙基吗啡乙酸盐（碳酸氢铵）缓冲液中通常保持 pH8.0~8.5，其浓度为 1~10μg/μl。
2) 加入酶，重量比为 1%~2%酶/蛋白，酶液为生产商推荐的最小的新鲜准备液。
3) 在 37℃摇床培养至少 4 小时。
4) 加入 10%三氟乙酸或冷冻以终止反应，降解液直接用于 HPLC 肽谱实验（离心除去任何不溶物质）。

5.4.5 胰凝乳蛋白酶

这个酶比胰蛋白酶展示了更广泛的专一性，该酶优化水解羧基端为芳香氨基酸的肽键，如苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和亮氨酸，如果延长反应时间也可以水解甲硫氨酸、谷氨酰胺和组氨酸的肽键。

注意：胰蛋白酶的操作步骤，同样适用于胰凝乳蛋白酶，只是需要的反应时间更短（约 1~3 小时），如果希望获得尽可能多数的小肽，一般可延长反应，时间至 12~24 小时。

5.4.6 嗜热菌蛋白酶

此酶对于疏水残基的氮末端有着广泛的专一性，（如亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、色氨酸），对氮末端为丙氨酸、酪氨酸、苏氨酸的降解反应相互缓慢，酶在 6~8 mol/L 尿素或 0.5%~1%SDS 中仍有活性。

注意：胰蛋白酶的反应条件同样适于嗜热菌蛋白酶，但缓冲液中必须含有 1~5 mmol/L 的碳酸钙以增强此酶的热稳定性，通常消化反应在 45℃下反应 1 小时。

5.4.7 内肽酶 Glu-C（蛋白酶 V8）

这个丝氨酸-内肽酶切割谷氨酸羧基末端的速度大约为其切割天冬氨酸残基为羧基端的 3000 倍（Sprensen et al. 1991）。碳酸氢铵缓冲液(pH7.8)或乙酸盐缓冲液(pH4.0)为推荐的缓冲体系来抵制对谷氨酸的裂解，这仅仅是抑制了酶的活力。

注意：最好的方法是在含有还原酶浓度的 0.05 ~ 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液中进行可降低酶的浓度和减少降解时间。

5.4.8 内肽酶 Asp-N

Asp-N 是一个金属蛋白酶用于裂解天冬氨酸氮末端的肽链，对于氧化的蛋白，也可裂解半胱磺酸的肽键，为了防止在谷氨酸处的裂解，可采用减低酶浓度和减少反应的时间。

注意：0.05 mol/L 磷酸钠（pH8.0），如果蛋白难溶解的话，可以加入 1 mol/L 尿素或盐酸胍，或 0.01% SDS 在 37℃反应 1 ~ 15 小时。

（陈 波 译 陈常庆 校）

参考文献

Aebersold RH, Leavitt J, Savedra RA, Hood LE, Kent SBH (1987) Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by one- or two-dimensional gel electrophoresis after in situ protease digestion on nitrocellulose. Proc Natl Acad Sci USA 84:6970–6974

Aitken A, Geisow MJ, Findlay JBC, Holmes C, Yarwood A (1989) Peptide preparation and characterization. In: Findlay JBC, Geisow MJ (eds) Protein sequencing – a practical approach, IRL, Oxford, New York, Tokyo, pp 43–67

Bommer UA, Kraft R, Kurzchalia TV, Price NT, Proud CG (1991) Amino acid sequence analysis of the β- and γ-subunits of eukaryotic initiation factor eIF-2. Identification of regions interacting with GTP. Biochim et Biophys Acta 1079:308–315

Bonaventura C, Bonaventura J, Stevens R, Millington D (1994) Acrylamide in polyacrylamide gels can modify proteins during electrophoresis. Anal Biochem 222:44–48

Butler PE (1989) Solubilization of membrane proteins by proteolysis. In: Beynon RJ, Bond JS (eds) Proteolytic enzymes – a practical approach, IRL, Oxford, New York, Tokyo, pp 193–200

Chernogolov A, Usanov S, Kraft R, Schwarz D (1994) Selective chemical modification of Cys^{264} with diiodofluorescein iodacetamide as a tool to study the membrane topology of cytochrome P450scc (CYP11A1). FEBS Lett 340:83–88

Fernandez J, DeMott M, Atherton D, Mische SM (1992) Internal protein sequence analysis: enzymatic digestion for less than 10 μg of protein bound to polyvinylidene difluoride or nitrocellulose membranes. Anal Biochem 201:255–264

Fernandez J, Andrews L, Mische SM (1994) An improved procedure for enzymatic digestion of polyvinylidene difluride-bound proteins for internal sequence analysis, Anal Biochem 218:112–117

Flannery AV, Beynon RJ, Bond JS (1989) Proteolysis of proteins for sequence analysis and peptide mapping. In: Beynon RJ, Bond JS (eds) Proteolytic enzymes – a practical approach. IRL Press, Oxford, New York, Tokyo, pp 145–161

Han KK, Richard C, Biserte G (1983) Current developments in chemical cleavage of proteins. Int J Biochem 15:875–884

Hellman U, Wernstedt C, Góñez J, Heldin C-H (1995) Improvement of an "in-gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. Anal Biochem 224:451–455

Hirano H, Komatsu S, Kajiwari H, Takagi Y, Tsunasawa, S (1993) Microsequence analysis of the N-terminally blocked proteins immobilized on polyvinylidene difluoride membrane by western blotting. Electrophoresis

14:839–846
Jahnen W, Ward LD, Reid GE, Moritz RL, Simpson J (1990) Internal amino acid sequencing of proteins by *in situ* cyanogen bromide cleavage in polyacrylamide gels. Biochem Biophys Res Commun 166:139–145
Jenö P, Mini T, Moes S, Hintermann E, Horsz, M, (1995) Internal sequences from proteins digested in polyacrylamide gels. Anal Biochem 224:75–82
Kraft R, Fessel R, Büttner D, Etzold G (1988) Manual N-terminal microsequencing of proteins electroeluted from polyacrylamide gel slices. Biol Chem Hoppe-Seyler 369:87–91
Kraft R, Kostka S, Hartmann E (1995) Microsequencing of proteins of the rough endoplasmic reticulum (rER) membrane. In: Atassi MZ Apella E. (eds) Methods in protein structure analysis – 1994. Plenum Corporation New York, pp 445–454
Kruft V, Wittmann-Liebold B (1991) Determination of peptide regions on the surface of the eubacterial and archaebacterial ribosome by limited proteolytic digestion. Biochemistry 30:11781–11787
Matsudaira P (1993) A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing. Academic, Inc USA
Misselwitz R, Kraft R, Kostka S, Fabian H, Welfle K, Pfeil W, Welfle H, Gerlach, D (1992) Limited proteolysis of streptokinase and properties of some fragments. Int J Biol Macromol 14:107–116
Ploug M, Stoffer B, Jensen AL (1992) In situ alkylation of cysteine residues in a hydrophobic membrane protein immobilized on polyvinylidene difluoride membranes by electroblotting prior to microsequence and amino acid analysis. Electrophoresis 13:148–153
Pratt JM (1989) Proteases as topological probes for membrane proteins In: Beynon RJ, Bond JS (eds) Proteolytic enzymes – a practical approach. IRL, Oxford, New York, Tokyo, pp 181–191, 1989
Price NC, Johnson CM (1989) Proteinases as probes of conformation of soluble proteins. In: Beynon RJ, Bond JS (eds) Proteolytic enzymes – a practical approach. IRL, Oxford, New York, Tokyo, pp 163–179, 1989
Rosenfeld J, Capdevielle J, Guillemot JC, Ferrara P(1992) In gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. Anal Biochem 203:173–179
Schägger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem 166:368–379
Sonderegger P, Jaussi R, Gehring H, Brunschweiler K, Christen P (1982) Peptide mapping of protein bands from polyacrylamide gel electrophpresis by chemical cleavage in gel pieces and re-electrophoresis. Anal Biochem 122:298–301
Sprensen SB, Sprensen TL, Breddam K (1991) Fragmentation of proteins by *S. aureus* strain V8 protease. Ammonium bicarbonate strongly inhibits the enzyme but does not improve the selectivity for glutamic acid. FEBS Lett 294:195–197
Stone KL, Williams KR (1993) Enzymatic digestion of proteins and HPLC peptide isolation. In: Matsudaira P (ed) A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing. Academic Press, Inc USA, pp 45–67
Strydom DJ, Kandror, K (1995) Identification of actin isoforms after *in situ* hydroxylamine cleavage on sequencer membranes. Serum actin is a cytoplasmic isoform. Biochem Biophys Res Commun 166:139–145
Vanfleteren RJ, Raymackers JG, Vanbun SM, Meheus LA (1992) Peptide mapping and microsequencing of proteins separated by SDS-PAGE after limited *in situ* acid hydrolysis. Biotechniques 12:550–557

第6章

肽的 HPLC 分离和薄层层析（TLC）指纹图

T. Choli-Papadopoulou，R. M. Kamp

6.1 引　言

随着新的、高灵敏的蛋白质化学检测方法（微量分离、氨基酸微量分析和微量测序）的发展，使大量以前未知的多肽得到了鉴定，开始研究的是小肽进而是中等分子量的肽类。

另外，用于氨基酸组成和序列分析进行结构鉴定所必需的样品量越来越少，以前必需几个毫微摩尔的纯品，现在只要微微摩尔量的物质就可进行部分或完全的结构鉴定。近年来，反相液相色谱（RP-LC）成为多肽分离和鉴定的主要工具，而另外的层析方法，如薄层层析，同样也用于多肽的分离。

6.1.1 薄层指纹技术

双向（二维）指纹技术（Wittman-Liebold and Kamp 1980; Wittman-Liebold and Lehmann 1980）分离多肽具有较好的分辨率，虽然它有回收率低等方面的一些缺点。根据所分离肽的类型和所用洗脱溶剂的不同，回收率在 40%～70%之间，通过薄层指纹技术纯化的多肽不需任何另外的纯化措施就能直接适用于微量测序分析。第一向是肽的电泳分离，这依赖于肽的净电荷和分子量（Offord 1966）；第二向分离是上行层析（ascending chromatography），这依靠于它们各自的分配系数，有好几种缓冲液用于肽的双向分离。电泳总是先于层析，因为它可以去除痕量的盐，盐会干扰指纹分析，因而必须完全避免。在冷却下电泳大约 2 小时后，将纤维素板置于室温中干燥，禁止使用高温或热吹风。上行层析大约需要 6～7 小时。干燥的纤维素板用含 0.15%茚三酮的可力丁/乙酸/乙醇（30：100：870 v/v）染色，将含肽的斑点挖出，碱性肽用 50%乙酸洗脱，酸性肽用 20%吡啶或 0.07%的氨水洗脱。

6.1.2 HPLC 纯化

HPLC 是非常有用的肽谱分析工具，它广泛应用于蛋白质的结构分析。通常用 5～10μm的大孔烷基化硅胶吸附剂为色谱柱的填料，通过增加有机溶剂的浓度进行梯度洗脱，该技术进一步发展的目标是加快分析速度和提高灵敏度（Kalghatgi and Horvath

1988; Lu and Lai 1986; Stone and Williams 1986; Wilson et al. 1986)。针对不同的应用应选择相应的反相载体，小肽(<30个氨基酸)的分离可用小孔径(<100 Å)C_{18}载体，粒度为5~10μm(译者;原文为5~10mm)，柱长10~25cm。被证明对小肽具有分离作用的C_{18}柱为:Altex Ultrasphere C_8和C_{18}柱（Beckmann, Munich，德国)和Waters NovaPak C_{18}柱（Waters, Milford, MA，美国);大分子量的肽可同样应用Vydac C_{18}载体（The Separation Group, Hesperia, CA, 美国)和Synchropak C_{18}300 Å载体（Synchrom, Linden，美国)进行分离。

作肽图及其进一步序列分析的重要性在于：①分子克隆中寡核苷酸探针的制备；②为cDNA推导的氨基酸序列提供证据；③为重组DNA产生的蛋白质作指纹分析；④蛋白质的完整结构鉴定；⑤确定翻译后修饰的位点；⑥决定簇的定位；⑦二硫键的确定。低于毫微摩尔量蛋白质进行作肽图分析会引起许多问题，并要增加额外的样品制备步骤(还原和烷基化后的脱盐、样品浓缩、多步层析纯化等步骤)，若利用微孔的色谱法则可以省去诸多麻烦。分子量小而含有多电荷的肽不能在普通的RP-HPLC体系上分离，这些不保留在柱上而流穿的肽可以用小孔径的载体（如ODS-Hypersil，80Å)，并在流动相中加入离子对试剂进行分离，用这种方式纯化的肽不需脱盐就能直接测序。

6.1.3 原位降解和HPLC分离联用技术

如果蛋白质的N端是封闭的，在玻璃纤维上的样品经CNBr原位处理就可以获得有用的序列信息（Simpson et al. 1984)，这需用短的RP-HPLC柱对混合肽脱盐（Kamp 1986)。在所需的分离时间上与传统方法（透析、氯仿-甲醇或三氯乙酸沉淀和开放式柱层析）相比，RP-HPLC耗时非常短，仅要5~10分钟，所以因损失和溶解性带来的问题就少了，脱盐干燥后的混合肽不需预先分离就可直接测序。如果蛋白序列是已知的，并且只要求了解结构信息，那么就可按上述方法进行分析，对膜蛋白而言由于肽的疏水特性，该方法的应用就相当困难，因而建议用PVDF膜印迹后测序代替RP-HPLC获得内部序列信息。经CNBr裂解并由RP-HPLC分离产生的肽不必脱盐就可进行Edman降解。从SDS-PAGE电泳印迹获得的蛋白质直接进行N端序列分析是由Vandekerckhove和Aebersold（Vandekerckhove et al. 1985; Aebersold et al. 1986）首先采用，现在已成为蛋白质微量测序的重要手段。在PVDF膜上进行原位酶法降解或用CNBr处理的化学降解也已由Fimmee等（1989）和Choli等（1990）报道了。对前者而言，在酶解缓冲液中加入10%~20%的甲醇可提高肽的回收率而不明显抑制酶的活性，但在酶解缓冲液中若有10%的乙腈的存在时无论用何种酶，其活性都会大大降低，所有方法都需要预先处理PVDF膜。由于疏水蛋白例如膜蛋白和膜相关蛋白/肽的溶解度小，在纯化过程中需加入离子型去垢剂如SDS，所以蛋白样品中会含有不同量的SDS，若超过0.1%将会干扰以后的酶解片段和肽的分离。几毫克的SDS会使反相HPLC柱的分辨率显著降低甚至会破坏液相柱，去除混合肽中SDS的最有效溶液是庚烷和异戊醇。翻译后修饰的肽也可由HPLC分离鉴定出来，除了赖氨酸外其他氨基酸组成相同的肽都可在不同时间被洗脱下来（Choli et al. 1988a, b)，这种效应可能是由于不同程度的赖氨酸残基甲基化所引起的。

6.2 用 HPLC 分离肽段

HPLC 是一个非常有用的分离肽的技术，使用挥发性和无紫外吸收的缓冲液具有如下优点：测试的高灵敏度和直接微量测序、电泳或氨基酸分析，无需附加任何脱盐步骤。针对不同的混合肽，可使用三种不同的具有挥发性的缓冲体系：

— 体系 1：缓冲液 A（0.1%三氟乙酸，TFA）；缓冲液 B（0.1%TFA 的乙腈）。

— 体系 2：缓冲液 A（2L 水中加入 1.5 ml 25%氨水和 0.25 ml 98%甲酸配制成甲酸铵缓冲液，pH7.8）；缓冲液 B（含 20%缓冲液 A 的甲醇）。

— 体系 3：缓冲液 A（2 L 水中加入 0.4 ml 25%氨水和 0.25 ml 98%甲酸配制成甲酸铵缓冲液，pH4.4）；缓冲液 B（含 20%缓冲液 A 的甲醇）。

下面将讨论一下细胞色素 c 胰蛋白酶水解肽的分离。

材料

— Waters HPLC 系统。系统组成：2 个泵、混合室、进样盘或自动进样器、紫外检测仪（220nm）或二极管矩阵检测器（Milford，MA，美国）

— HPLC 柱，例如 Vydac C_{18} 柱（250mm × 4 mm，300Å 孔径，5μm 颗粒）和预柱

— 重蒸三氟乙酸（TFA）

— HPLC 级乙腈

— HPLC 级水

— 柱保温箱

— 注射器

HPLC 分离步骤

1) 平衡柱子 20 分钟。
2) 开始梯度，但不进样，目的是为了测试柱的纯净度。
3) 若运行过程基线稳定，没有出现“鬼峰”，开始进样。
4) 将 100μg 胰蛋白酶水解物加到 100μl 0.1%TFA 中，离心去除不溶解的颗粒，进样。

分离条件

5) 将 UV 检测器设在 220nm，流速 1 ml/分钟，分离温度为 25℃，运行的梯度如下：
   — 50 分钟内 B 液由 5%至 40%
   — 2 分钟内 B 液由 40%至 80%
   — 保持 80%B 液 3 分钟
   — 3 分钟内 B 液由 80%至 5%

   胰蛋白酶水解后肽的分离图谱见图 6.1。
6) 收集组分并干燥（可用冻冷干法）（如 SpeedVac 浓缩仪）含有肽的组分，将干燥的样品溶解在 50μl 0.1%TFA 或 50%吡啶/水中，然后转移至氨基酸分析管或 PVDF 膜上进行测序。

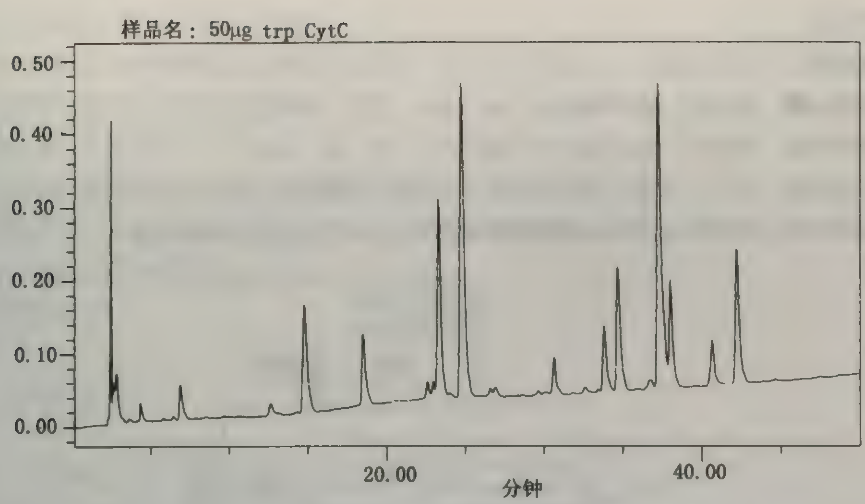


图 6.1 细胞色素 c 经胰蛋白酶酶解后在 Vydac C_{18} 柱上的分离。分离条件见正文 6.2。

评 价

分离肽的典型 HPLC 柱为 C_{18} 烷化硅胶柱，根据肽的疏水程度可以用 C_4 或 C_8 或 C_{18} 烷化载体，分离疏水和较大的肽时 C_4 柱更适用，然而对亲水和较小的肽则建议用 C_{18} 柱。根据肽链的长度选择合适孔径的载体可得到高的回收率。短而亲水的肽应在 80 Å 的载体上分离，分子量大的肽用 300 Å 的载体收率更高。用球形的硅胶分离具有较高的重复性，而使用不规则的和不同批号或不同供应商的载体材料会有分离重复性的问题。总之 HPLC 分离疏水性的肽具有速度快、效果好、分辨率高的特点。测序所需纯化肽的量采用 HPLC 制备比用薄层指纹技术大约少 5 倍。

6.3 薄层指纹技术

多肽可用薄层双向（二维）指纹技术分离，第一向是靠肽所带的净电荷，第二向是根据疏水性采用层析法进行分离。

材料

— 薄板 Cel 300（20cm × 20cm，厚 0.1cm，Macherey & Nagel，Düren，德国）
— 带水冷却装置的薄层电泳池（Desaga，Heidelberg，德国）(见图 6.2)
— 1 ~ 10ml 移液管
— 层析池，用于 20cm × 20cm 板进行上行层析
— 滤纸
— 尖刮刀

缓冲液和溶液

— 50% 乙酸

— 50%甲酸
— 20%吡啶
— 电泳缓冲液：吡啶/乙酸/丙酮/水（50：100：375：1975，v/v）
— 层析缓冲液：吡啶/丁醇/乙酸/水（50：75：15：60，v/v）
— 茚三酮溶液：含 0.1%茚三酮的可力丁/乙酸/乙醇溶液（30：100：870，v/v）
— 荧光胺溶液：含 5%吡啶的丙酮溶液和含 0.05%荧光胺的丙酮溶液

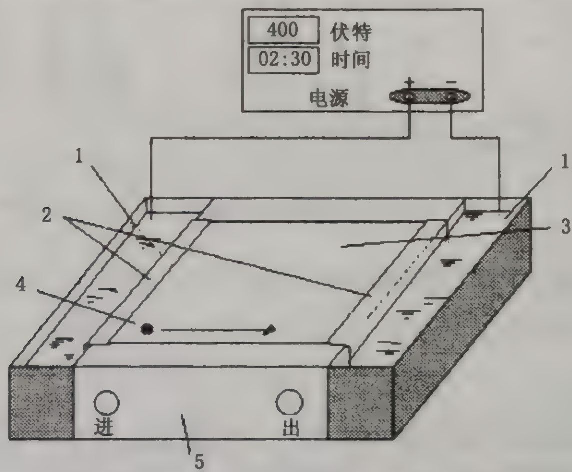


图 6.2 薄层电泳池示意图
1. 缓冲液槽；2. 电泳隔条；3. 薄板；4. 点样位置；5. 冷却盘。

6.3.1 第一向电泳

1) 将薄板在电泳缓冲液中浸湿，用滤纸快速擦干置入电泳池中。
2) 打开电泳池的水冷装置（图 6.2）。
3) 电极槽中加满电泳缓冲液（pH4.4），用电泳条将薄板与缓冲液相连接。
4) 400V 预电泳 5 分钟，确认薄板的湿润程度。合适电泳的条件为：Cel 300 板为 12 ~ 18mA；Cel 400 板为 10 ~ 15mA。
5) 在板的角上（矩左侧 4cm，矩底部 3cm）点样 5nmol 胰蛋白酶酶解的肽 1 ~ 3μl，注意不要用手或移液器碰到薄板。
6) 加 1 滴 DNP-OH（二硝基苯磺酸）或酰胺黑作为标记在样品上面板的顶部。
7) 盖好电泳池，在冷却下，于 400V 电泳 2 小时。
8) 电泳结束后，将纤维素板置室温干燥 1 小时，不能用高温或热吹风干燥。

6.3.2 第二向层析

1) 将纤维素板放入含有 PBEW 缓冲液的层析池中，放置 7 小时（板底部浸入缓冲液 5mm）。

2）层析完毕置于室温干燥 1 小时。

3）用含 5%吡啶的丙酮溶液湿润纤维素板，置于排气柜中，室温干燥 1 分钟，再用含 0.05%荧光胺的丙酮溶液湿润。

4）室温干燥 15 分钟。

5）在 366 nm 波长的紫外灯下将肽用软铅笔标记后挖出。

6）在纤维素板上喷上 0.3%的茚三酮以显现出在荧光胺染色时很弱的肽斑，然后将板置暗处使肽斑完全显色。

7）挖出所有的肽。

6.3.3 肽的洗脱

将从三张薄层板上的肽洗脱下来，以用于：

— OPA 分析后的氨基酸分析：需用回收肽的 1/20

— 末端基团分析：需用回收量的 1/20

— 测序：剩下的肽

1）用刮刀挖出肽的斑点转移到微量离心管（Eppendorf）中。

2）根据用途选用酸或吡啶洗脱多肽：

— 碱性肽：2×200 μl 50%乙酸

— 酸性肽：2×200 μl 20%吡啶

— 只用于氨基酸分析：2×200 μl 5.7 mol/L HCl

— 进行过甲酸氧化（如 Cys 测定）的肽：2×100 μl 70%甲酸

3）将挖下的肽用旋转混合仪小心混合，再用 Eppendorf 管混合仪振动 30 分钟。

4）将悬浮的纤维素溶液于 5000r/min 离心 5 分钟，收集上清，转移至水解管或测序管中。

5）重复洗脱一次，与上次抽提液合并。

6）将肽的抽提物真空干燥，置 -20℃保存。

6.3.4 评　价

在第一向电泳分离肽的混合物时应在离开板底部 3cm 的中间位置上进行，400V 电泳 1 小时。参照第一次的茚三酮显色结果，下一次样品分离时要将带负电荷的肽置于阳极附近（通常离开左侧 4cm），而带正电荷的肽靠近阴性。

肽检测时应先用荧光胺染色再进行茚三酮显色，因为肽与荧光胺反应是可逆的，可以进一步用于蛋白质的 N 端序列分析，而茚三酮的显色是不可逆的，会破坏 N 端氨基，仅有少数几个末端基团可以进一步的测序分析。要解决这个问题，可用 0.15%代替 0.3%茚三酮进行反应，经稀释后的茚三酮溶液，仅会部分破坏 N 端的氨基酸和 Lys 侧链。肽会因 N 端氨基酸的不同显现出特异性的颜色，N 端为甘氨酸、苏氨酸和丝氨酸的肽会显示黄色，而 N 端为酪氨酸和组氨酸的肽则显示棕色。分离出的肽待荧光胺显色完全后，就能进行氨基酸定量分析和序列测定了。用特殊的显色试剂有可能检测出精氨

酸、酪氨酸和色氨酸残基，用含1%对-二甲氨基苯甲醛，2 mol/L HCl的丙酮液喷淋后，含有色氨酸的肽会显示出红色斑点，用含0.1%α-亚硝基-β萘酚的乙醇喷淋，再用10% HNO_3 干燥后，含色氨酸的肽在黄色背景下形成红色斑点。

含Arg的肽在喷上0.02%菲醌的乙醇液和10%NaOH/60%乙醇（v/v 1：1）后在紫外线（254nm）下显示出黄色的斑点。薄层指纹技术的优点是具有较高的重复性和分辨率，容易分离出适于微量测序分析用的多肽。缺点是回收率低，因肽的类型和洗脱溶剂不同回收率在40%～70%之间。总之，指纹技术的应用要根据混合肽的特性和实验室设备的实际情况而定。

参考文献

Aebersold RH, Teplow DB, Hood LE, Kent SBH (1986) Electroblotting onto activated glass. Biol Chem 261: 4229–4238

Choli T, Hennig P, Wittmann-Liebold B, Reinhardt R (1988a) Isolation, charakterization and microsequence analysis of a small basic methylated DNA-binding protein from the Archaebacterium Sulfolobus solfataricus. BBA 950: 193–203

Choli T, Wittmann-Liebold B, Reinhardt R (1988b) Microsequence analysis of DNA-binding proteins 7a, 7b and 7e from the Archaebacterium Sulfolobus acidocaldarius. J. Biol. Chem. 263: 7087–7093

Choli T, Kapp U, Wittmann-Liebold B (1990) Blotting of proteins onto Immobilon membranes. J Chrom 476: 59–72

Fimmel S, Choli T., Dencher NA, Buldt G, Wittmann-Liebold B (1989) Topography of surface-exposed amino acids in the membrane protein bacteriorhodopsin determineted by proteolysis and micro-sequencing. Biochim Biophys Acta 978: 231–240

Kalghatgi K, Horvath C (1988) Rapid peptide mapping by HPLC. J Chrom 443:343–354

Kamp RM (1986) High performance liquid chromatography of proteins. In: Wittmann-Liebold B, Salnikow J, Erdmann V (eds) Advanced methods in protein microsequence analysis. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp 21–33

Lu H-S, Lai P-H (1986) Use of narrow-bore high performance liquid chromatography for microanalysis of protein structure. J Chrom 368: 215–231

Offord RE (1966) Electrophoretic mobilities of peptides on paper and their use in the determination of amide groups. Nature 211: 591–593

Simpson RJ, Nice EC (1984) In situ cyanogen bromide cleavage of N-terminally blocked proteins in a gas-phase sequencer. Biochem Int 8: 787–791

Stone KL, Williams KR (1986) High performance liquid chromatographic peptide mapping and amino acid analysis in the subnanomol range. J Chrom 359: 203–212

Vandekerckhove J, Bauw G, Puype M, Van Damm J, Van Montagu M (1985) Protein blotting on polybrene-coated glass-fiber sheets. Eur J Biochem 152:9–19

Wilson KJ, Huang AL, Brasseur MM, Yuan PN (1986) Microbore high performance liquid chromatography: An example of its applications in peptide characterization. Biochromatography 1: 106–112

Wittmann-Liebold B, Kamp RM (1980) Primary structure of ribosomal protein L29. Biochem Int 1: 436–445

Wittmann-Liebold B, Lehmann A (1980) New approaches to sequencing by micro-and automatic solid phase technique. In: Birr Ch (ed) Methods in peptide and protein sequence analysis. Elsevier, Amsterdam, pp 49–72

第7章

原位降解肽的微量分离

A. Otto

7.1 引 言

高效的双向聚丙烯酰胺电泳（HP-2-DE）可最多分离出 10 000 种蛋白质（Klose 1975; Klose and Kobalz 1995）。如果从凝胶印迹至疏水膜上的蛋白质 N 端没有封闭，可按常规方法从少于 10 pmol 的量中获得 N 端的序列信息。由于许多蛋白质 N 端是封闭的，因而要得到内部序列信息有必要将蛋白质降解成肽段，图 7.1 示意了一个新的降解方法，图的左侧 A 表示在聚丙烯酰胺介质内蛋白质的片段的分离。近年来发表了许多的分离方法（Rosenfeld 等. 1992; Jenö et al. 1995; Hellman et al. 1995），在此，我们采用 Eckerskorn 和 Lottspeich（1989）和 Kellermann 等 （1995）的实验方法，但在利用 micro-

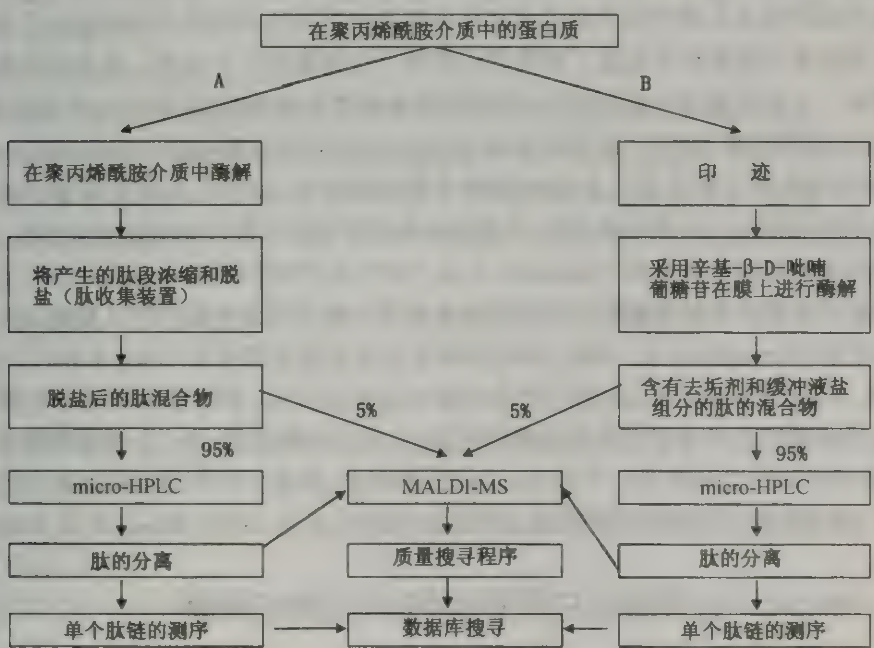


图 7.1 聚丙烯酰胺凝胶分离的蛋白质原位降解后产生的混合肽进行微量分离的流程示意图。路线 A，胶内降解；路线 B，膜上降解，两条路线都是可行的。最好将 MALDI-MS 作为由内部肽段鉴定蛋白质的第一步。

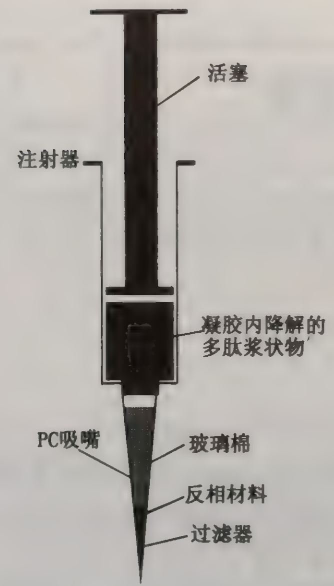


图7.2　肽的收集装置，对凝胶内蛋白质降解产生的多肽进行浓缩和脱盐。工作方法见正文。

HPLC（肽的回收装置，Otto et al. 1996）收集肽段之前，对样品的制备方法稍作改动。这个新方法的优点是利用很少量的反相材料将酶解后的肽的洗脱和浓缩结合了起来，比在酶切前从很多凝胶块中收集、浓缩蛋白质的方法更简单，更有效。这种新的收集肽的装置见图 7.2,它不需要昂贵的配件,能很容易地在实验室中应用,该方法在混合肽 MALDI-MS（介质辅助激光解吸/离子化质谱 matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry）的探针制备中非常有用,能得到高质量的质谱图,因为它去除了可能干扰结果的缓冲液中的盐组分。在实际操作中,仅用 5%的酶解物就可进行 MALDI-MS 分析。

将印迹在硝酸纤维素膜（Aebersold et al. 1987）或 PVDF 膜（Madsudeira 1987）上的蛋白质通过原位酶解法裂解出蛋白质内部的肽段是另一种可行的方法（图7.1右侧,B）。根据最近研究结果（Fernandez et al. 1992,1994）使用含有去垢剂如氢化的 Triton X-100（Jungblut et al.1994; Zeindl-Eberhart et al.1994）的酶切缓冲液进行反应,有可能利用结合在膜上的少于10μg 样品就可以得到蛋白质的内部序列信息。我们选择辛基-β-D-吡喃葡糖苷作为去垢剂,是因为这种去污剂不会干扰 MALDI-MS 的测定。质谱分析也可以用来获得另外的序列信息,通过数据库的搜索对蛋白质进行鉴定（Pappin et al.1993; Thiede et al.1996）。

7.2　HP-2-DE 分离后蛋白质在凝胶内的原位降解

7.2.1　材　料

设　备

— 热混合仪（Eppendorf 型 5436,Hamburg,德国）

— 底部有不锈钢网的 1ml Tuberculin 注射器(WITA,Teltow,德国)
— 1ml Tuberculin 注射器(B.Braun,Melsungen,德国)
— 2ml 一次性的注射器(B.Braun,Melsungen,德国)
— 肽的收集装置(WITA,Teltow,德国)
— 微量离心机(Beckman,Glenrothes,苏格兰)
— SpeedVac(SAVANT,Farmingdale,NY,美国)

缓冲液和试剂

— 洗涤缓冲液:50%乙腈,含 100mmol/L Tris-HCl (pH 8.5)
— 酶解缓冲液 1:100mmol/L Tris-HCl (pH8.1);1mmol/L $CaCl_2$,10%乙腈
— 溶液 1:2%三氟乙酸(TFA)的水溶液
— 溶液 2:60%乙腈,含 0.1% TFA
— 溶液 3:HPLC 级水,含 0.1% TFA
— 胰蛋白酶(测序级,Promega,Madison,WI,美国)

7.2.2 步 骤

凝胶片制备

1) 从凝胶上切出经染色的蛋白质斑点,用洗涤缓冲液于 30℃洗 2 次,共 20 分钟(缓冲液必须盖住胶片)。
2) 将两次洗涤缩小胶的上清去除。
3) 加入酶解缓冲液,使凝胶膨胀至原来体积,再去掉凝胶中多余的缓冲液。
4)将凝胶填入不装活塞的1ml Tuberculin 注射器中(切掉 Luer 接头),底部接上不锈钢筛板(网眼大小约100μm),装上活塞将胶通过筛板压到 Eppendorf 管中,这种方法适用于大的凝胶或凝胶条带和许多凝胶块的降解制备,如果只有两小块凝胶可直接用刮刀切碎。
5) 在 SpeedVac 中干燥凝胶,使体积收缩约 50%(不要完全干燥)。

酶 解

1) 让收缩的胶浸在 50~100μl 含 0.5~2μg 胰蛋白酶(酶:蛋白为 1:10)的酶解缓冲液 1 中吸水膨胀。
2) 再加入约 100~300μl 缓冲液 1(视胶的量而定),待凝胶形成浆状物后置于 37℃保温 15 小时。
3) 酶解后,加入 2 倍体积的溶液 1(相对于酶解缓冲液 1 的量)于 60℃摇动保温 1 小时。

肽的提取

利用肽的收集装置 (见图 7.2) 从凝胶浆状物中提取多肽:它由一个 2ml 的一次性注射器和一个专用的直接连在注射器上的 Eppendorf 吸嘴组成。收集肽的吸嘴 (PC-tip) 中含有 5mg 的选择性反相材料和填充空间用的玻璃棉组成。

PC-tip 的制作

1）将 PC-tip 连到含溶液 2 的注射器上，通过 PC-tip 排掉 1ml 溶液 2。
2）拔下 PC-tip，再接到另一支含有溶液 3 的注射器上，同样排掉 1ml。
3）从第二个注射器上拔掉 PC-tip，将 PC-tip 注满溶液 3，再连到一支不带活塞的空注射器上。
4）在一支 1ml Eppendorf 移液器（尖端切掉 2mm）的协助下，将第 3 步酶解后的凝胶浆状物装入到这支空注射器中，接上活塞并推压使凝胶缓慢通过 PC-tip，将胶浸在溶液 3 中，重复操作一次。
5）从注射器上拔掉 PC-tip，拿出玻璃棉塞用剃须刀片切去含有凝胶颗粒的上部棉花。
6）按上述方式，再用 1ml 溶液 3 清洗一次。
7）另取一支干净的 1ml 注射器，注入溶液 2，接上 PC-tip，用 500μl 溶液将肽从反相材料上洗脱至 1.5ml Eppendorf 管中。
8）留下 5%用于 MALDI-MS 分析，其余的冷冻干燥。
9）将剩余 95%的溶液用 SpeedVac 除去乙腈，使溶液体积剩至 60μl 左右，用于 Micro-HPLC 分离多肽。

7.3 印迹在 PVDF 膜上的蛋白质原位降解

7.3.1 材　料

设　备

— 热混合仪（Eppendorf 型 5436，Hamburg，德国）
— 微量离心机（Beckman，Glenrothes，苏格兰）
— SpeedVac（SAVANT，Farmindale，NY，美国）

缓冲液和试剂

— 洗涤溶液：50%乙腈
— 酶解缓冲液 2：50mmol/L Tris-HCl（pH 8.5），1mmol/L EDTA，1%辛基-β-D-吡喃葡糖苷，10%乙腈
— 酶解缓冲液 3：50mmol/L Tris-HCl（pH 8.1），1mmol/L $CaCl_2$，1%辛基-β-D-吡喃葡糖苷，10%乙腈
— 溶液 2：60%乙腈，含 0.1%TFA
— 溶液 3：HPLC 级水，含 0.1%TFA
— 溶液 4：10%TFA 的水溶液
— Lys-C 内切蛋白酶（测序级，Boehringer，Mannheim，德国）
— 胰蛋白酶（测序级，Promega，Madison．WI，美国）

7.3.2 步　骤

膜片的制备

1）用洗涤溶液清洗膜上的蛋白质斑点(蛋白质用考马斯兰或硫氰酸铵染色)，清洗 1分钟。
2）切下大约 1～2 mm^2 润湿膜片，转移至 0.5ml Eppendorf 管中。

Lys-C 降解

3a）加入 10～30μl 含 0.2～0.5μg Lys-C 内切蛋白酶的酶切缓冲液 2，于 36℃保温 15 小时（缓冲液要浸没膜片）。

胰蛋白酶酶切降解

3b）加入 10～30μl 含 0.2～0.5μg 修饰胰蛋白酶的酶切缓冲液 3，于 37℃保温 15 小时。

肽的抽提

1）胰蛋白酶降解后超声 5 分钟，离心，将上清转移至一个新的 0.5ml Eppendorf 管中。
2）依次用 20～50μl 的溶液 3 和 20～50μl 溶液 2 清洗、超声，离心收集溶液。
3）留下 5%体积的收集液用于 MALDI-MS 分析，从质量数据库中搜寻鉴定多肽。
4）通过 SpeedVac 去除剩余 95%收集液中的有机溶剂，使体积剩下约 1/4。
5）用 5μl 10%TFA 酸化。

7.4 酶切多肽片段的分离

酶切产生的多肽片段可以用微孔或窄孔反相液相色谱柱分离，若要达到此类柱子的最佳分离效果，必须使用 HPLC 装置，从而能够在 20～200μl/分钟之间具有稳定的流速和高度重复性的梯度。调整检测器使之适合很小的流速，并要直接连在 HPLC 柱的出口端，检测器到部分收集器间要使用仅有几微升容量的内径较细的管，避免收集在离心管中的肽峰形加宽和延迟时间长。多肽主要在 214nm 波长处检测，另外的两个波长 260nm 和 280nm 用于检测芳香族或修饰的氨基酸（如吡啶基乙基化的半胱氨酸）。

7.4.1 材　料

设　备

— 适用于微量 HPLC 的装置（SMART 系统，Pharmacia Biotech，Freiburg，德国）
— HPLC 柱：μRPC C_2/C_{18}，SC 2.1/10（内径 2.1mm，长度 10cm，颗粒大小 3μm，Pharmacia Biotech，Freiburg，德国）
— SpeedVac（SAVANT，Farmingdale，NY，美国）
— 微量离心机（Beckman，Glenrothes，苏格兰）
— 0.5ml Eppendorf 管架

溶　液

— 洗脱液 A：含 0.1% TFA 的 HPLC 级水

— 洗脱液 B：含 0.095% TFA 的乙腈

微量分离的条件

1）将余下 95%的凝胶内降解或印迹斑点降解来源的多肽混合液于微量离心机中高速离心 3 分钟。

2）上清液加到 HPLC 进样器中。

3）用含 0.1% TFA 的乙腈线性梯度分离多肽，梯度为：

— 5%B 相，5 分钟

— 5%～45%B 相，5～85 分钟

— 45%～85%B 相，85～105 分钟

流速为 100μl/分钟，用 μPeak Monitor（Pharmacia Biotech，Freiburg，德国）检测肽峰，波长 214、260 和 280nm，按 214nm 波长的检测自动收集肽。

7.5　结果和讨论

在凝胶内或印迹在 PVDF 膜上的蛋白质原位降解后的结果以图 7.3、7.4 为例。用 20 块一系列 的 HP-2-DE 鉴定胶分离人心肌蛋白，经常规的考马斯蓝染色后，从 10 块

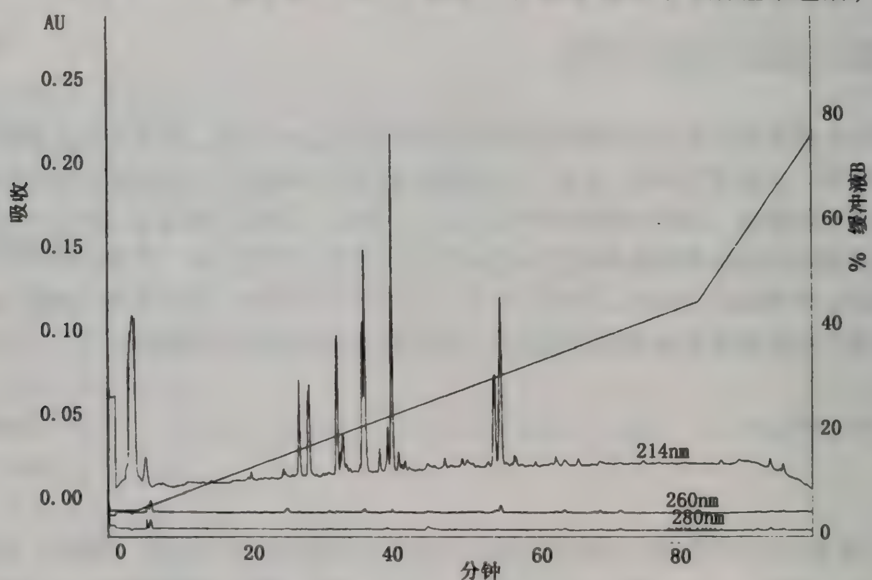


图 7.3　凝胶原位降解后的 HPLC 肽谱，胰酶降解后用 μRPC C_2/C_{18}，SC2.1/10 HPLC 柱分离。人心肌蛋白经 HP-2-DE 凝胶分离，切下 10 个含该蛋白的凝胶块（10 块胶），酶切后用多肽收集装置洗脱、浓缩和脱盐，再进样至微量 HPLC 柱中进行分离。该蛋白经 MALDI-MS（图 7.5）鉴定为肌球蛋白轻链 2。

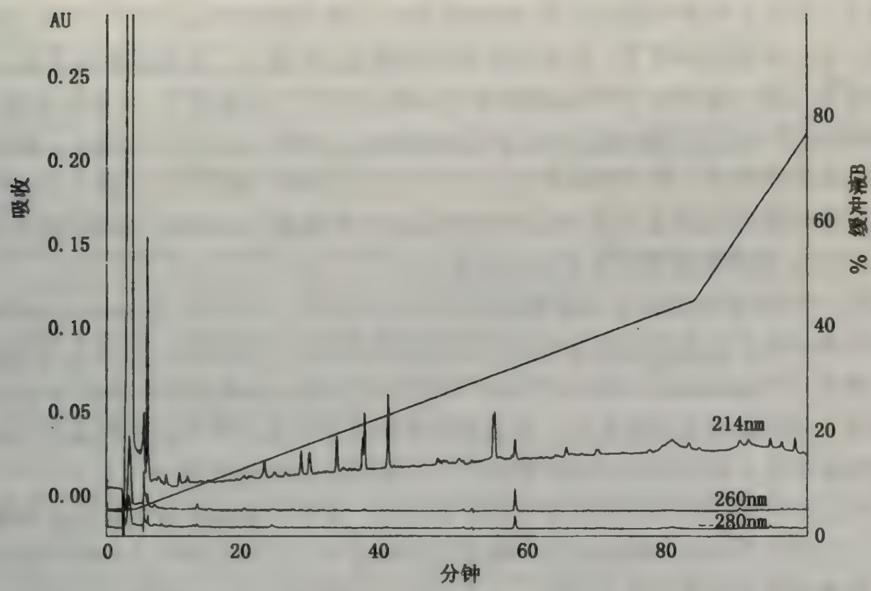


图 7.4 膜上原位降解后 HPLC 肽谱，胰酶降解后用 μRPC C_2/C_{18}，SC 2.1/10 HPLC 柱分离。将 8 块 HP-2-DE 凝胶印迹在 PVDF 膜上，切下感兴趣的蛋白质斑点。蛋白质与图 7.3 中的相同。

凝胶中切下目的蛋白质，将这 10 块凝胶用胰酶降解。产生的多肽按图 7.1A 途径利用多肽收集装置浓缩、脱盐。取 5%进行 MALDI-MS 分析，0.8%的样品作为 MS 靶。质谱结果见图 7.5。

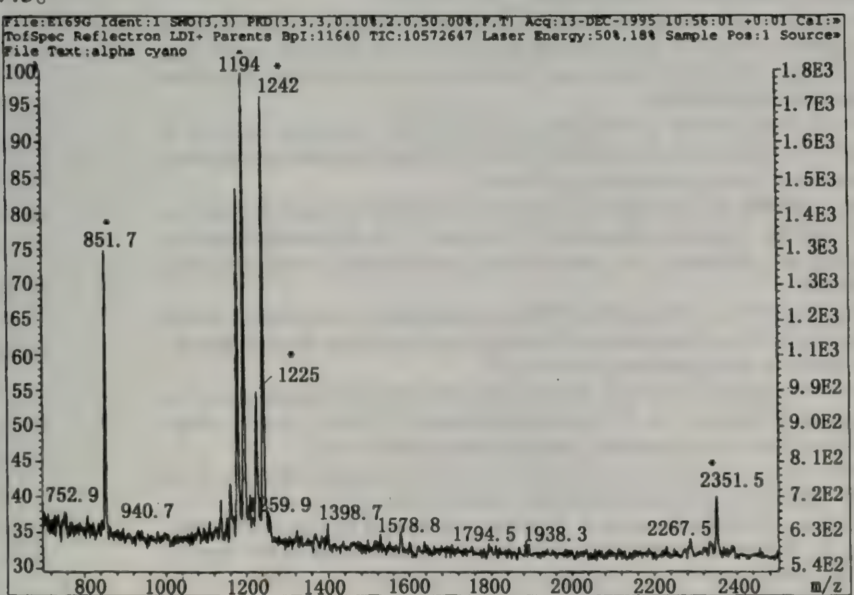


图 7.5 MALDI-MS 质谱。人心肌蛋白经 HP-2-DE 凝胶电泳分离后，蛋白质斑点在凝胶内酶切产生肽段，再经肽收集装置的浓缩和脱盐进行质谱分析。通过五组相匹配的肽段（星号标记），鉴定出该蛋白质为肌球蛋白轻链 2。该谱图由 Fisons TofSpec 按照反射模式绘出。

大部分（95%）的多肽混合物在 SMART 系统上用 μRPC C_2/C_{18}，SC 2.1/10 HPLC 柱进行分离。另一套实验路线为：将 8 块凝胶印迹到 PVDF 膜上，硫氰酸铵染色后，将目的蛋白的斑点（第一套方法中相同的位置）从膜上切下，按照图 7.1B 途径用含辛基-β-D-吡喃葡糖苷去垢剂的酶解缓冲液进行胰酶降解。同样，5%用于 MALDI-MS 分析，0.8%作为 MS 靶的样品，95%的样品按上述方法进行分离。如图 7.3、图 7.4 所示，凝胶和 PVDF 膜降解的肽图是一致的，但所得肽的产率凝胶法比 PVDF 膜印迹法高 3 倍(已考虑了 PVDF 膜方法仅用了 8 个蛋白斑点)。

MALDI-MS 分析可以和分子量搜寻程序 FRAGMOD 一同联用（Thiede et al.1996），质量分析明确地显示出两种方法分析的蛋白质都是肌球蛋白轻链 2。然而在 MOWSE 多肽质量数据库（Pappin et al. 1993）中搜寻不到该蛋白质，这是因为该程序不能识别修饰的蛋白质，例如甲硫氨酸的氧化。通过多肽收集装置制备的多肽混合物由于已去除了缓冲液中的盐组分，故 MALDI-MS 质谱分析时可得到较好的信号/噪音比。

通过膜上原位降解制备多肽混合物的方法简单、省时，且很多蛋白质可较方便地固定在膜上，但蛋白质从凝胶转移到膜的印迹过程中会有一定量的损失，另外，疏水性强的蛋白质降解后肽的洗脱收率也较低，故在凝胶内的酶切方法常常更为优先采用。

（李　民 译　陈常庆 校）

参考文献

Aebersold R., Teplow D, Hood LE, Kent SBH (1986) Electroblotting onto activated glass membranes. J Biol Chem 261: 4229–4238

Aebersold RH, Leavitt J, Savedra RA, Hood LE, Kent SBH (1987) Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by one- or two-dimensional gel electrophoresis after in situ protease digestion on nitrocellulose. Proc Natl Acad Sci USA 84:6970–6974

Eckerskorn C, Lottspeich F (1989) Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by gel electrophoresis after tryptic digestion in polyacrylamide matrix. Chromatographia 28: 92–94

Fernandez J, DeMott M, Atherton D, Mische SM (1992) Internal protein sequence analysis: enzymatic digestion for less than 10 μg of protein bound to polyvinylidene difluoride or nitrocellulose membranes. Anal Biochem 201:255–264

Fernandez J, Andrews L, Mische SM (1994) An improved procedure for enzymatic digestion of polyvinylidene difluoride-bound proteins for internal sequence analysis. Anal Biochem 218:112–117

Hellman U, Wernstedt C, Gone`z J, Heldin CH (1995) Improvement of an "in-gel"digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. Anal Biochem 224:451–455

Jenö P, Mini T, Moes S, Hintermann E, Horsz M, (1995) Internal sequences from proteins digested in polyacrylamide gels. Anal Biochem 224:75–82

Jungblut P, Otto A, Zeindl-Eberhart E, Pleissner KP, Knecht M, Regitz-Zagrosek V, Fleck E, Wittmann-Liebold B (1994) Protein composition of the human heart: the construction of a myocardial two-dimensional electrophoresis database. Electrophoresis 15:685–707

Kellermann J, Grimm R, Eckerskorn C (1995) "Enzymatische Spaltung von Proteinen im SDS-PAGE - teilweise Automatisierung der Probenvorbereitung". In: Kellner R, Lottspeich HE, Meyer HE (eds) 2. Arbeitstagung "Mikromethoden in der Proteinchemie", 26.-30. Juni 1995 Max-Planck Institut für Biochemie, Martinsried

Klose J (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis in mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. Humangenetik 26: 231–243

Klose J, Kobalz U (1995) High resolution two-dimensional gel electrophoresis. Electrophoresis 16: 1034–1059

Matsudeira P (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. J Biol Chem 262:10035–10038

Otto A, Thiede B, Müller E-C, Scheler C, Jungblut P (1996) Identification of human myocardial proteins separated by 2-DE using an effective sample preparation for mass spectrometry. Electrophoresis (in press)

Pappin DJC, Hojrup P, Bleasby AJ (1993) Rapid Identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. Current Biology 3:327–332

Rosenfeld J, Capdevielle J, Guillemot JC, Ferrara P (1992) In gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. Anal Biochem 203:173–179

Thiede B, Otto A, Zimny-Arndt U, Müller E-C, Jungblut P (1996) Identification of human myocardial proteins separated by two-dimensional electrophoresis with matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. Electrophoresis 17:588–599

Zeindl-Eberhart E, Jungblut P, Otto A, Rabes HM (1994) Characterization of tumor-associated protein variants during hepatocarcinogenesis in the rat. J Biol Chem 269:14589–14594

第8章

采用胶内蛋白酶降解的微量测序用的肽的分离

U. Hellman

8.1 背　　景

与15年前分子生物学出现时所作的预言相比，现在对经典的氨基酸序列分析的要求提高了。其目标不再是通过直接测序去确定一个蛋白质的全部一级结构，而是只对纯化的蛋白质酶解后的几个较短的肽段进行序列测定。所得的序列通常用于寡核苷酸探针的设计，以便于随后的cDNA克隆和DNA测序。内部肽段序列的另一个重要应用是设计和生产肽的抗体，它是一种对分析和制备都非常有用的工具。此外，另一种用途是用作纯蛋白的阳性鉴定。

目前，大量分析的是一些由培养细胞所得的微量样品，因此，要求有一个高灵敏度的制备技术不能算是过分。常规使用的柱层析方法所遇到的一个普遍的问题是蛋白质往往会因吸附在柱的载体和各种吸嘴、试管和收集管的表面，而导致样品的损耗，这对大多数样品是典型的，并且是在处理膜相关蛋白这类疏水蛋白中经常遇到的问题。

从聚丙烯酰胺凝胶电泳后经考马斯蓝染色的可见蛋白条带去制备蛋白酶酶解样品，是即能有高回收率的微量纯化而又对于任何蛋白质都能实际操作的一个方便制备技术(Rosenfeld et al. 1992; Hellman et al. 1995)。这方法即可在纯化步骤早期也可在晚期使用，所要求的是必须有至少10～20pmol均一的样品，并确保分析的样品是目的蛋白而不是杂质。

下面将详细介绍在凝胶内酶解的实验操作，因为这在我们实验室里已经用分析了400种以上的蛋白质。

8.2 操作大纲

1) 切下条带，转移至1.5ml Eppendorf管。
2) 用脱色液洗去染色剂和SDS，再换用酶切缓冲液冲洗。
3) 完全干燥凝胶。
4) 再水化溶胀时将蛋白酶吸入聚丙烯酰胺凝胶。
5) 保温。
6) 抽提肽段。
7) 用液相层析分离肽段。

8.3 材　　料

胰蛋白酶酶解

— 洗涤液：0.2mol/L 碳酸氢铵，50%乙腈
— 酶解缓冲液：0.2mol/L 碳酸氢铵
— 抽提液：0.1%三氟乙酸水溶液，60%乙腈

LysC 酶解

— 洗涤液：0.5mol/L Tris-HCl（PH 9.2），50%乙腈
— 酶解缓冲液：0.1mol/L Tris-HCl（pH 9.2）
— 抽提液：0.1%三氟乙酸水溶液，60%乙腈

酶

— 修饰胰蛋白酶，测序级（Promega Corp.，Madison，WI，＃V5111）。将 20μg 冻干粉溶于 200μl 1 mmol/L HCl 中。将此 0.1μg/μl 的酶液等分为每份 12μl，－20℃贮藏。每次酶切消化时在底物中加入 5μl 酶液，由于胰酶酶解后产生的肽段数量大、片段小，故主要用于肽谱分析或蛋白质的鉴定。
— 内肽酶 LysC（*Achromobacter lyticus* 来源）（WAKO Chemicals GmbH，Neuss，Germany，＃129-02541）。5mg/ml 贮存于 0.1mol/L Tris-HCl（pH 9.2）缓冲液中，－20℃保存。再用相同的缓冲液稀释 100 倍，按 0.05μg/μl 分装，每份 25μl 于－20℃贮存。每次取 10μl 加入底物进行酶解。我们在许多分析中都采用了具有高度的专一性和稳定性的 LysC 这种蛋白酶，它能裂解出相对较长片段的肽，有利于寡核苷酸探针的设计。根据它的高度专一性，我们可以知道每个片段（除了 N 端的片段）的前端为一个赖氨酸残基，这种“双密码子”氨基酸有效影响了肽段的延长。

层析设备

一台理想的层析仪能够运行小孔或狭孔的反相液相层析。我们使用 SMART 系统（Pharmacia Biotech，Uppsala，Sweden），可同时对洗脱过程进行三个波长的检测，这样在序列分析前能提供了关于该肽的重要的信息。在肽的初步分离和进一步层析中，我们分别选用的液相柱为 μRPC C_2/C_{18} SC 2.1/10 和 Sephasil C_8 SC 2.1/10。

层析条件

所有在胶内酶解得到的蛋白质片段的分离均采用了反相液相层析法。用乙腈（含 0.06%三氟乙酸）的线性梯度洗脱（160 分钟内乙腈由 0%上升至 40%），流速为 100μl/分钟。各组分以特有的紫外吸收信号为选择标准，自动收集在 0.5ml Eppendorf 管内。检测波长分别为 215、254、280nm。这些波长的检测能对洗脱的肽提供很有价值的信息，因为苯丙氨酸或吡啶基乙基半胱氨酸（254nm），酪氨酸或色氨酸（280/254/215 比值）或芳香族杂质很容易被识别出来。

溶　剂

— 三氟乙酸，色谱级（Pierce，Rockford，IL，#28902）
— 乙腈，液相层析专用（Merck，Darmstadt，Germany # 1.14291）
— 水，Milli-Q 级，不允许接触塑料类制品如含芳香增塑剂的 PVC 导管

其　他

— 旋转蒸发器（干燥凝胶和缩小体积），也可用缓慢的氮气流替代
— 保温设备，如装有一小振荡器的空气加热的柱温箱

8.4 步　　骤

1) 将经**还原**和**烷基化**的样品进行标准 SDS-PAGE 或双向凝胶电泳分析。要确保有足够量的蛋白样品（一般 > 10pmol）。样品过多，有可能几个电泳泳道的条带会连在一起，若样品浓度太稀，最好先沉淀浓缩再少走几个泳道。我们用 4-乙烯吡啶作为烷化剂是因为它在半胱氨酸残基上加上了显色基团，就可通过在 254nm 特异性的紫外吸收鉴定出含半胱氨酸的肽。
2) 由标准的考马斯蓝方法染色和脱色。
3) 切出确认的条带。具体操作时最好走一个空泳道作为阴性对照，走一个已知量的标准蛋白（例如 4.5μg 还原和烷基化的卵清蛋白）作为阳性对照。

   注意：如果凝胶已经干了，无论是塑料膜包裹的还是在滤纸上都必须首先用水重新润湿，使它能从载体上分离下来。
4) 加入足够体积的洗涤液盖住凝胶，通常为 100～300μl，洗涤 2 次，于 30℃保温振荡至少 30 分钟再倒掉洗涤液。为了方便起见，可以随意延长一些时间而不会有问题，因为凝胶上的完整蛋白质很难被洗脱丢失。
5) 用氮气流或旋转蒸发仪将凝胶彻底干燥，这是与原来方法（Rosenfeld et al. 1992）相比的一个小的但却很重要的区别。
6) 用几微升酶解缓冲液使胶重新水化/重新膨胀。
7) 在凝胶膨胀过程中，加入 0.5μg 蛋白酶让它吸入凝胶中，然后每次加入一小份酶切缓冲液使胶慢慢膨胀至原来的大小（或稍大）。
8) 30℃保温过夜。
9) 加入三氟乙酸（TFA）至终浓度为 1%，使凝胶酸化。
10) 收集上清液，加抽提液（足够的体积覆盖凝胶）在 30℃至少保湿 30 分钟。将提取液与以前的上清液合并，重复提取。将提取液合并，如果愿意，保湿时间可以延长。
11) 旋转蒸发缩小体积为大约 1/3，从提取液中除去大多数有机溶剂。
12) 用小孔反相层析分离产生的片段。

8.5 结果和评论

图 8.1 中的例子（由 Lars Rönnstrand 博士友好提供）表示用亲和层析得到的样品，

合成肽固定在柱上。解吸的材料总量大约 20μg，作 SDS-PAGE，从考马斯亮蓝染色的带上可见各种分子量的相互作用蛋白，所有这些用 LysC 原位水解。来自 200 Da 带的层析

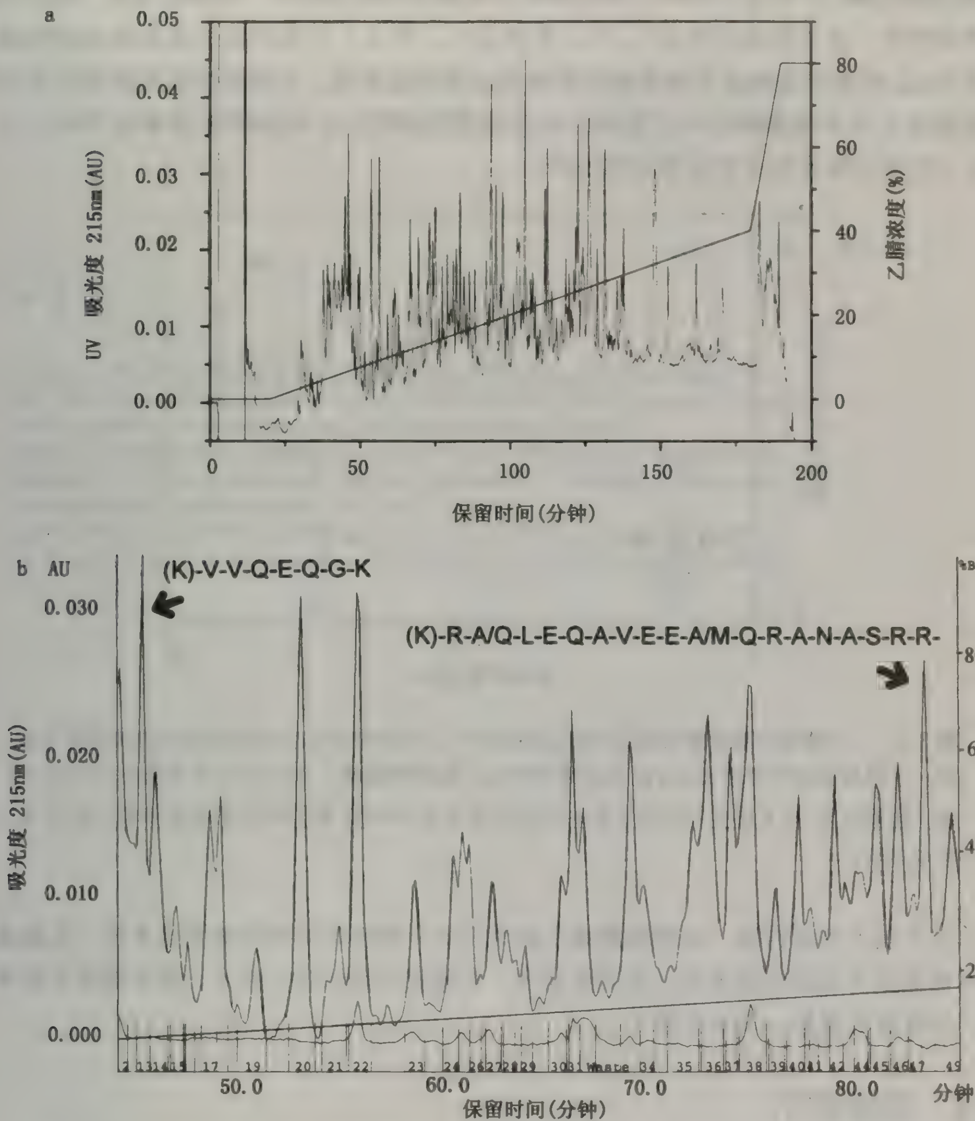


图 8.1　a. 一个 200kDa 蛋白质的蛋白酶水解片段的反相液相层分离。这些片段是用 LysC 专一性的蛋白水解酶在胶中原位水解产生的。b. 前面层析图的部分（45～85 分钟），标注了收集的组分（垂直的线）以及两个肽的氨基酸顺序。更详细的情况见正文。

图显示在图中。对一些选择的肽测序，得到结论：这个 200kDa 的蛋白质是肌球蛋白，这是一个出乎意料的发现。尽管大约 95% 的峰在层析图上可见，可能选择一些表观均一的肽，不经重新可以明确无误地确定样品。设定适当的参数，常规地，用自动收集峰的方法收集组分。图 8.1b 给出了具有代表性的例子，这是放大的部分（从 45 到 85 分钟）标出了决定的序列。

尽管使用现代专门的层析装置可得到很好的分辨率，有时碰巧一个组分含两个或多个肽。这通常由峰的不对称形状或有二个紫外不同的最大的信号所揭示，后者表示肽的芳香含量不均一。当有怀疑时，我们将 4 个分辨差的组分合并，用旋转蒸发，减少有机溶剂的浓度，将肽的混合物在 C_8 柱上重新层析。图 8.2 上部的曲线表示用胰蛋白酶水解从 Triton 酸脲凝胶电泳分离制备的组蛋白的部分层析图。底部的曲线是将两个作了标记的组分放在一起重新层析。重新层析这两个组分的回收率分别是 85% 和 82%。产生的这 4 个组分由序列分析发现是均一的。

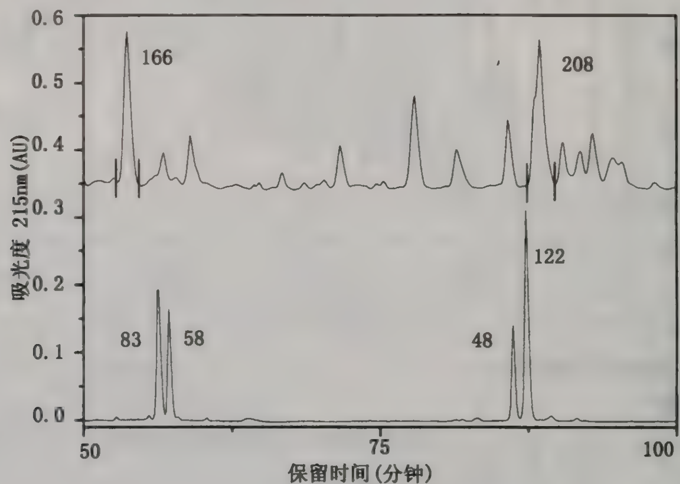


图 8.2 一个胰蛋白酶水解的组蛋白的反相层析图。为清楚起见仅有层析图的选择的部分显示。上部的曲线表明在 C_2/C_{18} 柱上水解的部分。底部的曲线，两个标记了的组分合并在一起，重新在 C_8 柱上层析，在组分旁给出的数字是用 SMART 软件积分给出的面积，以任意单位表示。

在干胶上的蛋白质，或者在滤纸上或者在两个塑料条之间可被原位水解，这就提供了对在档案中的蛋白质进行分析的可能性，这些胶可能已有几年了，也可能由于各种原因，如放射自显影，而被干燥了。

8.6 疑难解析

- 如果没有足够量的蛋白质存在凝胶带上从而得不到肽，原因可能是酶的活性太低。如果认为这个原因，用不同的酶，重复整个过程。在大多数情况下可以得到正的结果。这证明凝胶虽然被多次洗和提取失去样品完整性的可能性很小。
- 应该指出当得不到肽的时候，主要的原因是样品的量太低，因为蛋白质染色的效率不同，从考马斯亮蓝的强度来估计蛋白质的量是不可靠的。如前面所指出的建议用已知量的标准蛋白作为正的对照，并用对胶上的没有蛋白质的空白水解作为负的对照。
- 如果在一个大体积胶上作水解，回收将比较低，为了克服这点，在电泳前样品必须浓缩。所选择的方法依赖于样品，用氯仿/甲醇/水进行沉淀的方法可得到好的结果。

（Wessel and Flügge 1984）。

• 依我们的经验将 10～20pmol 的蛋白质加到聚丙烯酰胺凝胶上就可产生足够的材料用于序列分析，这是基于用 Applied Biosystems Model 470A 序列仪，后来的型号有近似 5 倍更高的灵敏度。

• 如果产生的肽的再现率高，重新水解凝胶不会导致另外的肽（Hellman et al. 1995）。

在胶中水解的步骤提供了一个快而普适的从任何蛋白产生蛋白内部片段的应用技术。

（李　民 译　陈常庆　校）

参考文献

Hellman U, Wernstedt C, Gonez J, Heldin C-H (1995) Improvement of an "in-gel" digestion procedure for the micropurification of internal protein fragments for amino acid sequencing. Anal Biochem 224: 451–455

Rosenfeld J, Capdeville J, Guillemot J C, Ferrara P (1992) In gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. Anal Biochem 203:173–179

Wessel D, Flügge U I (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. Anal Biochem 138:141–143

第三部分
手工和自动微量测序

第9章

自动微量测序：引言与概述

B. Wittmann-Liebold

9.1 引　　言

Frederick Sanger 和他的同事们首次测定了一种蛋白质即牛胰岛素的氨基酸线性结构，它包含2条肽链、51个氨基酸（Sanger and Thompson 1953），此后不久其他胰岛素也被研究了。用酸水解产生短的二肽、三肽和四肽，这些短肽可用纸层析分离并在N末端用2，4-二硝基氯苯（Sanger 试剂）标记以生成二硝基苯-（DNP-）肽。在肽水解和乙醚抽提标记的黄色的N末端DNP-氨基酸之后，由双向纸层析确定第一个残基。通过比较所有产生的肽，Sanger 最终成功地排列了两条多肽链中的氨基酸顺序。由于此项工作，他获得了1958年度诺贝尔奖。

1950年，Pehr Edman 引入了从N末端顺序降解多肽的一种化学技术，使蛋白质结构分析有了重大进展，这就是著名的 Edman 降解（Edman 1956）。使用这种方法，许多短肽激素被测序，如促黑激素 α 和 β（Harris and Lerner1957；Harris and Roos 1956）、ACTH（Li et al. 1955）、赖氨酸与精氨酸血管升压素和催产素（Du Vigneau 和 Acher 实验室），最后，发明了氨基酸分析仪（Spackman et al. 1958），首次允许高精度地，定量地分析多肽的氨基酸组成。这样才使大分子量蛋白质的一级结构研究和顺序测定成为可能，比如成人血红蛋白α链和β链，分别含有141个残基和146个残基（Braunitzer et al. 1961）、细胞色素 c（Margoliash et al. 1991）、鸡溶菌酶（Canfield 1963）、牛核酸酶（Smyth et al. 1963）、牛胰凝乳蛋白酶原 A（Keil et al. 1963）、烟草花叶病毒外壳蛋白（Wittmann-Liebold and Wittmann 1963）和抹香鲸肌红蛋白（Edmundson 1965）。只有可获得克量级且易于纯化的蛋白质才能完全测序。限制性步骤包括繁琐的单向纸层析或纸电泳肽分离技术，缺乏灵敏的氨基酸分析仪，以及纯化蛋白和肽有效的柱层析方法。在开始阶段，没有部分收集器，只能手工收集组分。接着，发明了使用 Dowex 50 的阳离子交换层析，但此项技术无法分离碱性的或疏水肽。实际上，在这些条件下只有50%的胰蛋白酶切的血红蛋白肽能从柱中回收到。一种替代方法是使用阴离子交换剂（Dowex 1）并用 pH 在9.0至5.0之间的挥发性吡啶乙酸缓冲液洗脱肽段（Rudloff and Braunitzer 1961）。然而，结果是实验室里有一股浓烈的吡啶气味！

1967年，Edman 和他的同事 Geoffry Begg 发表了自动 Edman 降解程序，可以用约7mg的纯化蛋白在一段合理的时间内完成约60步的多肽连续测序。该机器称为测序仪，允许蛋白质和肽结构的系统化研究并导致已知蛋白质序列的快速增加。不走运的是 Edman

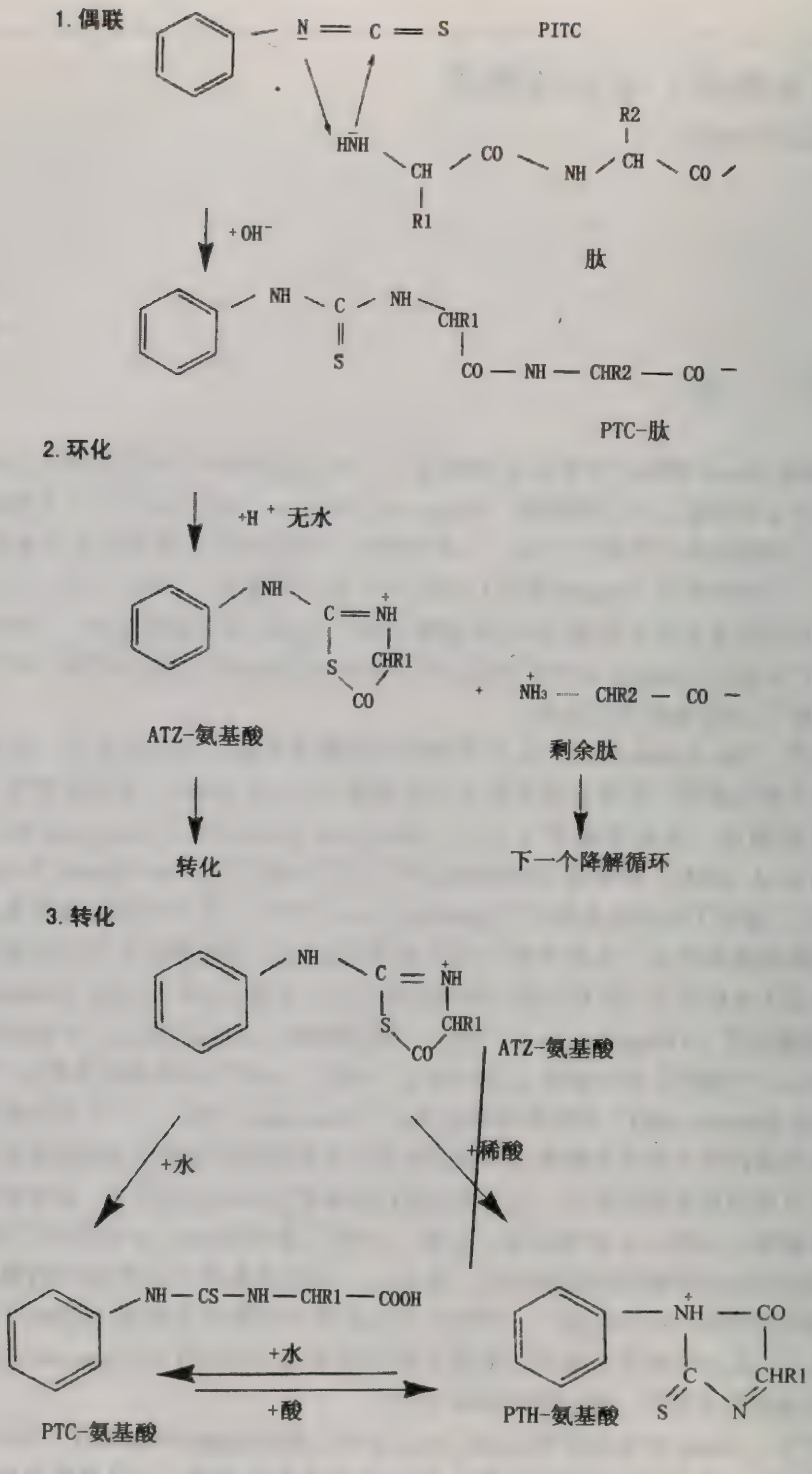


图 9.1　Edman 降解流程图。

并未因此项重大发明获诺贝尔奖，虽然此项发明是通向现代蛋白结构分析的钥匙并在生物学、生物化学和现代医学中开辟了许多新的领域。当前超过 71 800 个完整的蛋白质序列被收录到蛋白质序列数据库里（SwissProt and NBRF 数据库，1996 年 1 月版），这归功于氨基酸和核苷酸测序技术以及新的质谱技术的联合应用。可以预见已知蛋白质的数量会进一步增加。

Edman 十分完整地研究了降解过程（图 9.1）并引入了异硫氰酸苯酯（PITC）作为偶联试剂。他引入的化学过程至今仍无实质性的变化，所发生的变化主要是更加高级的机器工艺，可以使用更少的样品量进行降解。现在，只需要低于皮摩尔的量(几微克)，而以前需要毫克量级，并且用 50～100 皮摩尔的蛋白质即可获得延续序列。

9.2 Edman 降解

9.2.1 化学过程

偶联试剂 PITC 与多肽链自由 α1 N 末端基团反应，生成苯氨基硫甲酰肽（PTC 肽）。偶联反应在 45～48℃进行约 15 分钟(而早期机器需 30～40 分钟)并用大大过量的试剂使有机反应完全。用无水强酸如三氟乙酸(TFA)，使第一个残基环化，从而使该残基从剩余的肽链释放(裂解)出来，并成为 2-苯胺基-噻唑啉酮衍生物（ATZ 氨基酸）（图 9.1）。

第一轮降解(循环)后，剩余的多肽链可进入下一次以及后续的降解循环。Edman 还引入通过水溶酸处理使 ATZ 氨基酸衍生物转化(异构化)为更加稳定的乙内酰苯硫脲(PTH 氨基酸)的方法，但这转化方法在当初的很多年不得不手工完成。最终，释放的 ATZ 氨基酸衍生物被自动导入转化瓶（Wittmann-Liebold et al. 1976）。当机器适用于较小量蛋白质分析时，试剂和溶剂体积必须从毫升级调整到微升级，并引入了新的阀门，以及更小的转化器(Wittmann-Liebold et al. 1976；Wittmann-Liebold 1981)。

PTH 氨基酸衍生物的鉴定通过纸层析和用碘-淀粉反应染色完成（Edman and Henschen 1975）。尽管 Edman 序列分析仪的降解是有效的，但由于反应副产物干扰纸层析鉴定，使释放出来的 PTH 氨基酸的直接鉴定变得更加复杂（见图 9.2）。

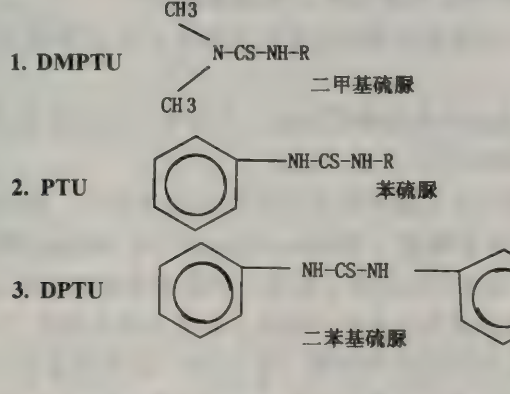


图 9.2 Edman 反应的副产物。这些副产物存在于 PTH-氨基酸的 HPLC-柱中。

即使是现代微量测序，PITC 试剂的水解副产物的形成仍无法避免。因为这个原因，手工降解是结合剩余肽氨基酸分析进行的，即每个步骤后取等分肽样进行酸水解和组成分析。或者，粗的 PTH 氨基酸进行酸水解，释放的氨基酸用氨基酸分析仪分析（所谓后水解）。最初，Edman 降解用纸条法完成（Fraenkel-Conrat et al. 1955；Shelton and Schroeder 1960），运用该方法，制备性单向纸层析上的肽区带在充满挥发性碱（吡啶）蒸汽的干燥器中与 PITC 反应。各个肽的好几个纸条经 PITC 处理，并干燥及用苯和乙酸乙酯洗去多余的试剂。裂解在另一个充满 TFA 蒸汽的干燥器中进行，TFA 蒸汽由抽真空产生。ATZ 氨基酸用乙基醚抽提并丢弃，而每轮降解循环后的一个肽条用 20% 吡啶洗脱，以进行氨基酸组成分析，从而确定少了哪个氨基酸(减法 Edman)，那时进行肽段序列分析需要微摩尔的量。Edman 降解与丹酰技术结合可获得更高的灵敏度：抽提等分的降解肽与二甲基氨基萘磺酰氯(丹酰氯)反应,生成荧光性衍生物(Gray and Hartley 1963)。用酸来水解所产生的丹酰-肽，其 N 末端丹酰氨基酸用聚酰胺膜上双向薄层层析来抽提和鉴定。该分析法的不足之处是在每个循环中有肽样品损失。然而，荧光丹酰氨基酸衍生物可在纳摩尔到亚纳摩尔的范围内检测到。Chang 试剂 DABITC（二甲氨基偶氮苯异硫氰酸酯）（Chang and Creaser 1976）的引入在通向更高敏感度和更高质量的微量测序的道路上迈出了新的和创造性的一步，用该方法可以在 3cm × 3cm 聚酰胺膜上在纳摩尔到皮摩尔范围内直接确定释放的肉眼可见的红色 DABTH 氨基酸（见第 10 章）。

9.2.2 基于 Edman 的测序仪

在基于 Edman 化学过程的测序仪上可有效地进行蛋白质和肽的微量测序。序列由分段化学步骤确定，即在机器里从 N 末端依次降解多肽链的氨基酸。测序仪降解可比人工过程获得更高的重复产率(见下文)和更高的灵敏度。这是由于氧的最佳隔离，在一定惰性气体(Ar 或氮气)压力下机器中所有试剂的良好保存，测序仪部件的耐用性和高性能(Wittmann-Liebold,1981,1986,1992)以及释放的氨基酸衍生物 UV 探测(254 或 268nm)的高灵敏度。

机器中的 Edman 化学过程包括三个不同的反应（图 9.1）：

- 碱性条件下 Edman 试剂 PITC 与蛋白质 α-氨基酸偶联
- 在强无水酸条件下第一个残基从剩余完整的多肽链上以 2-苯胺基噻唑啉酮(ATZ 氨基酸)裂解下来。
- 稀酸条件下，ATZ-氨基酸在转化器里转化（异构化）为更稳定的苯基乙内酰硫脲衍生物（PTH 氨基酸）(图 9.1b)

所有这些反应完全自动进行并且循环许多次以读出延续序列，释放的 PTH 氨基酸由高效液相层析(HPLC)在线定量测定（Wittmann-Liebold and Ashman 1985）。典型地，10 到 100 皮摩尔的样品被加入到测序仪的反应器里。所需的量取决于样品的质量、氨基酸顺序和所要的序列长短。降解质量也在很大程度上取决于样品纯度、分子量、单个序列和测序仪的技术局限性以及化学试剂的质量。至多 50 ~ 60 个残基可以准确确定，常常序列可进一步读下去，但在后面的步骤里实际上所有的氨基酸都存在。因此，必须减去前面的循环而且读出序列需要丰富的经验，并很容易错误解读。在最佳的技术条件下，机

器可以达到96%～98%的重复收率（图9.3），这意味着第50个循环时，第50位的氨基酸残基最多只有约10%～20%收率而存在多到80%～90%前面的PTH氨基酸（所谓重

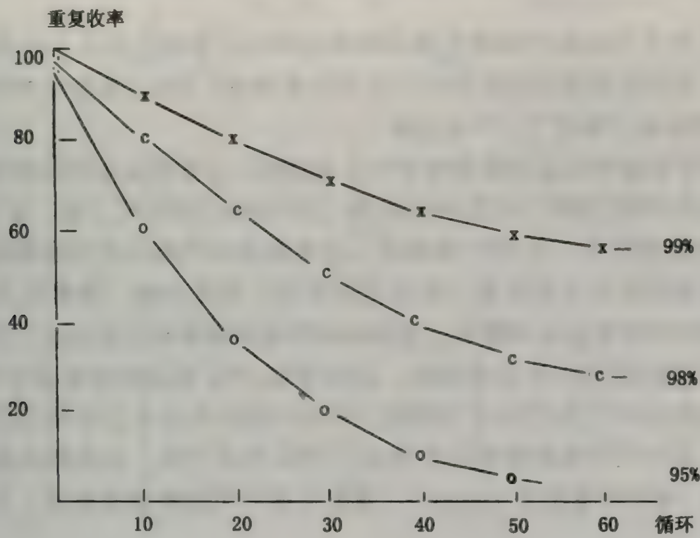


图9.3　95%、98%和99%降解的重复降解收率的理论计算值。测序仪通常可达到95%～98%，只有获得了98%的重复收率才可解读延续降解结果。如果有不稳定氨基酸（Ser、Thr、Trp等）出现或样品洗出，理论收率会大量减少。

a

$$重复收率 = \sqrt[x]{\frac{\text{pmol AA}_{n+x}}{\text{pmol AA}_{n}}}$$

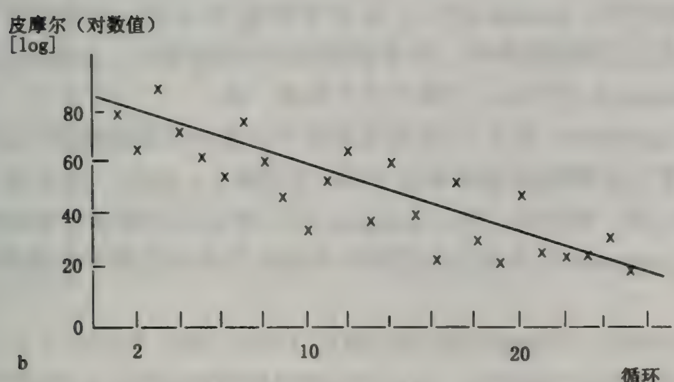


图9.4　一次运行的实验重复收率的计算。由于每种氨基酸获得的结果不同，只有相同的残基的收率才可比较，如Ala在第n步和第n+x步的收率（pmol）等，根据给出的公式（a）计算。或者，每次循环所释放的皮摩尔质量对循环数作图（对数坐标），外推到第一步的值给出重复收率(b)。

叠或拖尾），这样使鉴定困难。所以，连续运行的测序仪的重复收率必须优于96%。为了判断测序仪的实际降解和性能，常计算起始收率（第一个释放的PTH氨基酸）和重复收率（图9.4）。

测序仪配备了用于与标准PTH氨基酸混和物比较以定量确定每个PTH氨基酸衍生物的软件。而且，软件包能进行起始循环（无PTH氨基酸）HPLC梯度层析的背景校正和/或减去前面循环以助于确定下一个氨基酸。

由于三甲基胺非常易挥发且容易用惰性气体流清除，大多数在用的测序仪用三甲胺水溶液作为碱使肽与PITC偶联。在更新的机器（如Procise测序仪）里，这些碱由N-甲基哌啶的水/甲醇溶液替代。与PITC偶联后，过量的试剂和碱必须用有机溶剂如庚烷和乙酸乙酯反复洗和多次的干燥步骤（惰性气体吹洗）彻底去除。裂解在无水TFA中完成以避免多肽链内部的肽链水解断裂。这种内部肽键的裂解对样品的进一步降解有严重的影响，因为可能形成新的N末端基团，这将增加PTH氨基酸层析谱的背景噪声。这样的肽键水解断裂会发生在含水的TFA中，所以，TFA中的水分必须完全去除。因为TFA的吸湿性，在空气中重新装瓶已经增加了TFA的水污染。大的蛋白质中更容易出现不稳定的肽键（最弱的肽键是Asp-Pro），更有可能产生新释放的氨基，导致严重的背景噪声。

裂解后，酸必须用大量惰性气流清除。然后，释放的氨基酸的噻唑啉酮溶解在丁基氯中并转移至转化器里，转化在25%～40%TFA溶液中进行，转化结束后，转化介质被干燥去除，PTH氨基酸溶解于合适的溶剂混合物以自动注入HPLC系统的柱中。通常，测序仪装备有梯度HPLC系统，但也能对PTH-氨基酸进行等梯度洗脱。

高效降解的关键是使用高质量的试剂和溶剂（测序纯化学试剂），必须不含其他成分，主要是醛类、过氧化物和自由基。如不小心会导致循环过程中N末端氨基酸的封闭，以及降解停止或释放的氨基酸遭破坏，而且会洗出一些样品，主要是短的疏水肽。这些情况下，已开始使用多肽与结合在玻璃膜上合适的支持物共价结合的方法（Laursen 1977；Wittmann-Liebold 1986；Machleidt et al. 1973）。支持物结合的肽能装入进行Edman降解的柱中（固相测序仪，Laursen 1971），或者支持物-结合肽（如膜结合肽）被引入筒、印迹筒或流过式反应器进行降解。芳香氨膜固定肽的修饰可以直接在流过式反应器里原位完成（Herfurth et al. 1991a）。在蛋白质上样前，用1，5-二甲基-1，5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物（polybrene，图9.5）处理支持物可以减少样品的洗出。polybrene是一种四重碱，有助于蛋白质膜粘贴到玻璃或PVDF支持物上。以前，因为蛋白质膜不稳定，很容易碎裂和（或）被洗出，引入polybrene用于将蛋白质膜固定到旋转杯测序仪的玻璃壁上。然而polybrene并不形成共价键而是提供与蛋白质带负电残基的静电相互作用。

高灵敏度机器的构造（Wittmann-Liebold 1981，1986，1992；Hewick et al. 1981）以及它们不同安装调制部件将在下面讨论，过去为检测释放的氨基酸衍生物使用过好几种可能的方法，其中有气体层析法、各种薄层方法以及质谱。最终，随着HPLC的发展，此项技术成为PTH-氨基酸鉴定的常规方法（Zimmermann et al. 1977）并在后来装备了使其自动化的在线探测系统，这个系统就在所有测序仪上普遍安装了。

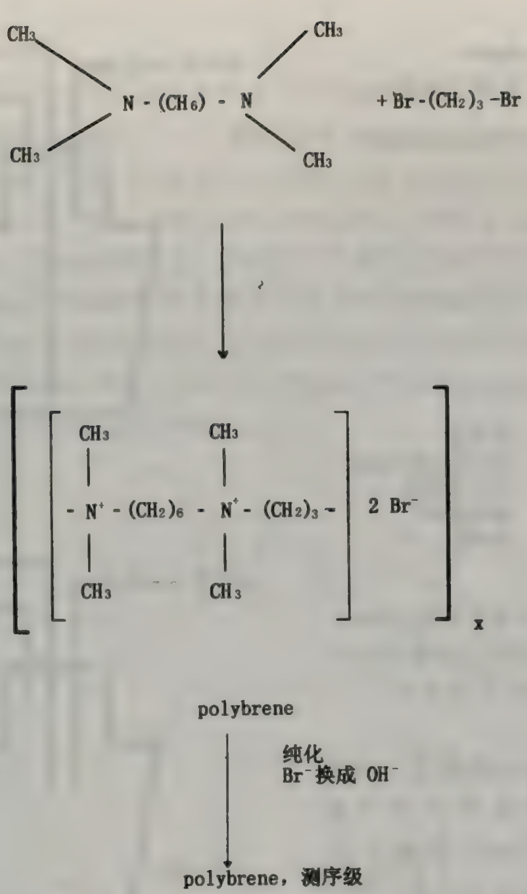


图 9.5 polybrene 的形成和结构。

9.2.3 材 料

设 备

测序仪包括下面的部件：

— 反应器
— 转化器
— HPLC 检测系统
— 阀门系统
— 加热器
— 反应瓶系统
— 惰性气体供应系统（氩气或氮气）
— 带有仪表、量器、针阀等的气体流通系统
— 贮存和执行降解的计算机
— 转化和 HPLC 程序

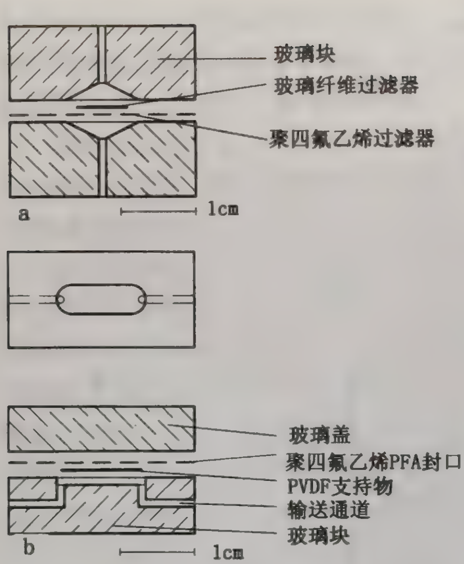


图 9.6 测序反应器：a. 筒式反应器（Hewick and Hunkapiller 1981）；b. 流过式反应器（Fischer et al.1989）（上）前视图（下）截面图。

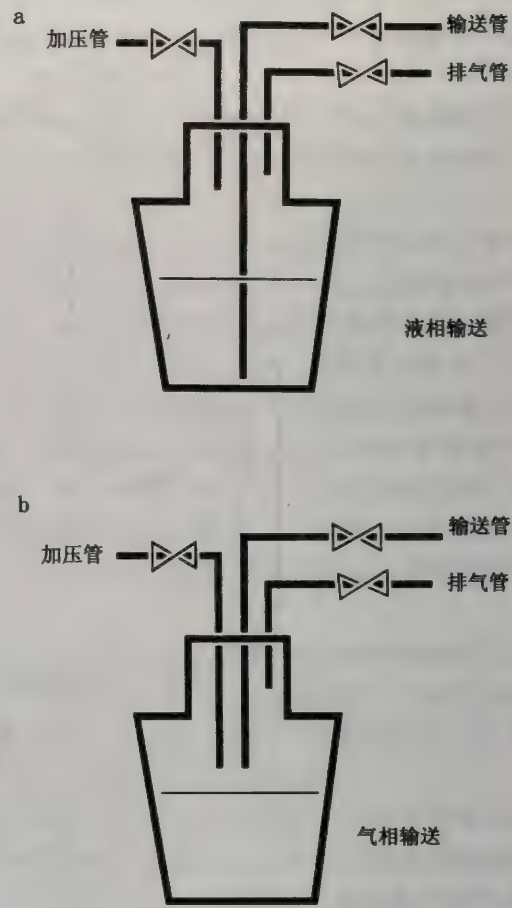


图 9.7 a. 在测序仪中液态输送；b. 与气态输送。通常碱或酸以气态方式输送（惰性气体的输入和输出管高于容器中的试剂）或液态方式（输出管插入试剂溶液，见正文）。

测序仪的主要部分是降解进行的反应器，最普遍安装的是筒式反应器（Hewick and Hunkapiller 1981）如图 9.6a；或者使用用于印迹的印迹反应器，柱式（如用于固相测序）或流过式反应器（Fischer et al.1989）如图 9.6b。

计算机控制数据的采集、储存和处理，所有的部件必须经久耐用并且不被测序化学品腐蚀和反应。最关键的是 PITC 和 TFA，二者与各种多孔的聚四氟乙烯（Teflon）材料缓慢反应。因而，一些机器中阀门的关键部件是用玻璃制的，比如 Knauer 仪器。还有，必须避免酸和碱的交叉反应。这样，容器瓶的气体供应必须设计成避免相互流通的方式，例如，安装不同的阀用以加压、放气以及输送，每个容器瓶安装一个阀门（图 9.7）。这意味着所有的容器安装有三种可独立操作的阀门。替代的做法是用适当的电子控制设置精确的压力，这样加压阀可以省却。另外，必须安装废弃和收集阀门，以将排出的流体导向废物容器或转化器或 PTH 分析仪系统。测序仪程序包括操纵所有这些阀门和控制时间设置，它指导试剂和溶剂的精确输送，控制反应器里的主降解程序和转化器里的分支程序。它也指导 HPLC 程序的启动和执行，保持反应器、转化器和 HPLC 柱炉内的温度并给出各种事件的信号，如流体从反应器到转化器的转移、转化程序的启动、PTH 氨基酸溶液从转化器到 HPLC 系统的转移以及上样的启始。

试剂和溶剂

在循环重复过程中，所有试剂和溶剂是全自动输送的。还有，它们必须精确输送并且与上轮循环中的量正好相等。为了提供精确的输送，设计了与阀门配合的回路(Wittmann-Liebold 1981)。或者，使用阀门系统的内部几何形状以测量体积（Wittmann-Liebold 1981；Fischer et al.1989)。目前市场上的测序仪，如来自 Knauer，Berlin 和 Applied Biosystems/Perkin Elmer（Procise 测序仪）的测序仪使用了这两个方法。给容器瓶加压和放气，用于输入反应器、转化器和探测系统以及用于液体传输的阀门被安装在使用共同传输管的单元里（Wittmann-Liebold 1981)。这些组件也可以装配成一块，如杂合辐射形阀门系统（图 9.8，WITA GmbH 专利所有)，它将反应器和转化器放在环的中央，使从不同阀门单元到反应器，转化器的距离最小化。

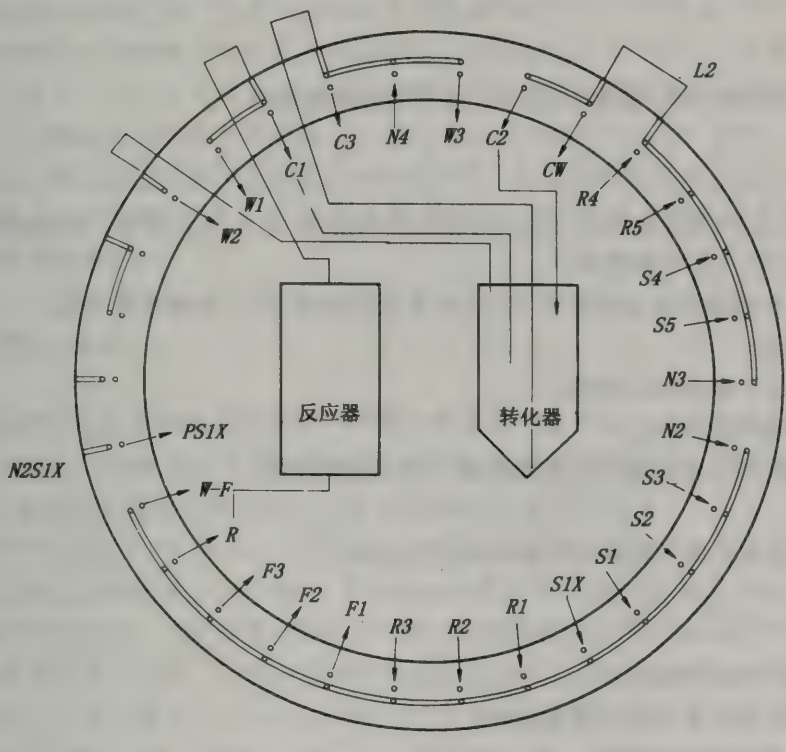


图 9.8　带中央反应器和转化器的杂合辐射形阀门系统。所有必要的阀（加压、换气、输送、废物和收集阀）安排在一个块中，反应器和转化器在中间（一种新型 Berlin 测序仪的阀门排布，据 Horst Graffunder)。根据目的不同，杂合辐射形阀门系统可有不同数量的阀门端口与中央输送管连接。

用于测序仪内的试剂(R)和溶剂(S)如下：

— R1：5%PITC 的庚烷溶液

— R2：三甲基胺（TMA）水溶液（见下文)；也可选 N-甲基哌啶水/甲醇溶液

— R3：无水三氟乙酸（TFA)

— R4：25%或40%TFA水溶液
— R5：PTH氨基酸标准混合物乙腈溶液，如50μl含25pmol
— S1：n-正庚烷
— S2：乙酸乙酯
— S3：1-氯丁烷（丁基氯）
— S4：20%乙腈水溶液；一些供应商加入乙酸钠缓冲液
— S5：乙腈或甲醇

如前所述，所有的化学试剂必须是高纯度级的，纯度由UV吸收、IR谱和残留水含量测定来衡量(Meinicke and Tschesche 1986)；它们可用氧化铝(中性)过滤和氮气下从玻璃柱重蒸馏纯化(见Meinicke and Tscheche 1986)。最后，试剂和溶剂必须用标准蛋白质进行测序测试，如β-乳球蛋白、核酸酶、肌红蛋白或其他蛋白，以保证最佳测序性能。

实验流程

45℃重复两到三次，需要20分钟。由下面的步骤组成：

偶　联

1) 碱的输送，12%TMA水溶液(R2)，以气态形式输送(见上文)；或者，以液态形式输送4%TMA（R2）水/甲醇溶液。
2) 输送可完全润湿样品过滤器的5%PITC正庚烷溶液(R1)，接着短暂干燥。
3) 重复碱输送。
4) 45℃～48℃下延迟反应时间。
5) 惰性气体流干燥试剂。
6) 正庚烷(S1)和乙酸乙酯(S2)重复洗涤，导入废物容器。
7) 干燥。

此后衍生化的蛋白质即PTC肽可以进行裂解。

裂　解

1) 输送几微升无水TFA（R3）。
2) 45℃～48℃反应3分钟（延迟时间）。
3) 惰性气体流干燥以去除酸。
4) 输送丁基氯（S3）以溶解释放的苯胺噻唑啉酮（ATZ氨基酸）。
5) ATZ氨基酸/丁基氯溶液输送入转化器。
6) 重复丁基氯抽提，收集至转化器或丢弃(导入废物容器)。

转　化

1) 输送25%～40%TFA水溶液（转化介质，R4）至转化器。
2) 45℃～50℃转化10～20分钟（包括液体干燥）。
3) PTH氨基酸溶解于一种合适的溶剂混合物(S4)(如20%乙腈水溶液含或不含乙酸钠添加剂以调节pH)，这样可直接注入在线HPLC系统的HPLC柱。

4) 用溶剂 S4 或 S5（甲醇或乙腈）洗涤转化器，导入废物器。

在线探测系统

1) 通过回路转移 PTH 氨基酸溶液（用以控制体积）至上样系统。
2) 将总 PTH 溶液的合适等分（50%～80%）转移入柱。
3) 启动 HPLC -梯度。
4) 在下一个氨基酸上样前重新平衡 HPLC 柱到初始条件。

液态方式中碱以液体输送，而用在气态方式反应器只以碱蒸汽饱和。液态方式中典型的碱输送量为 10～50μl。某些机器中，液体流被脉冲惰性气体中断（脉冲液态方式），这可以避免碱快速漂洗经过反应器因而减少样品洗出量。在气态方式中，惰性气体（氩气或氮气）给烧瓶加压，为碱和水饱和并输送此气体蒸汽混合物进入反应器。因此，避免了任何多肽样品的洗出，这些样品倾向于溶在碱混合物中。结果是，在气态方式下，控制输送的阀门必须在整个反应期间保持开放，而在液态方式下它们只在输送液体时才短暂开放。因而，气态方式下，12%的碱被迅速耗尽且依据环境温度，迟早必须更换新容器瓶，以给偶联反应提供合适的条件。液态方式下几微升 4%TMA 溶液（加入 30%乙醇、甲醇、乙酸乙酯或乙腈用以润湿 PVDF 过滤器）足以维持流过式反应器内偶联反应过程所需的 pH9.0（湿相技术，Herfurth et al. 1991b)。此方法大大地减少了所需 R2 的量并也可以用于印迹筒。

9.2.4 HPLC 系统

在线 HPLC 由两个特殊的泵组成，可允许低流量（约 200μl）并只产生非常小的基线噪音或基线漂移。检测系统必须能够在低于皮摩尔范围检测到 PTH 氨基酸（微量比色池）。一个典型 PTH 氨基酸的 HPLC 分离（梯度模式）示于图 9.9。

某些测序仪使用分析型 4mm（内径）C_{18} 反相柱而其他的用 2mm 微孔柱。溶剂混合物(S4)由乙腈水溶液组成，其中加入了与初始分离条件大致相同浓度和 pH 的乙酸钠。此混合物中有机溶剂（乙腈的量）略少于 HPLC 系统的起始浓度（初始条件）以将注入的 PTH 氨基酸在柱顶上浓缩。因此，上样的体积不能太大，但必须保证能溶解转化器里的 PTH 氨基酸。因而，需要 50～100μl 体积，大约 50～75μl 被用于上样。基于此，使用内径小于 2mm 的微孔柱相当困难。为保证可重复的进样，通常只有总 PTH 氨基酸溶液 50%的等分试样被注入 HPLC 柱。上样过程中的气泡必须避免，因此必须在程序中编入上样前的几秒钟延迟时间。可能发生无进样的情况，产生的原因是测序仪和分析仪之间的长传送距离，自发产生的气泡、管道阻塞或进样阀门或转化器未拧紧。

用于分离 PTH 氨基酸的 HPLC 梯度由缓冲液 A 形成，如 3%(Procise)或 5%(477A 测序仪)加入 3mol/L 乙酸钠缓冲液(分别为 pH3.8 和 pH4.6)的四氢呋喃水溶液，此混合物可将组氨酸和精氨酸与所有其他 PTH 氨基酸分离开。缓冲液 B 是乙腈(梯度纯)，初始条件因测序仪而异，从 8%到 10%B。分离过程需要 20～25 分钟，另加重新平衡柱体的时间。等梯度系统(Shimadzu and Berlin 测序仪)采用约 38%乙腈水溶液和乙酸钠的混和物，此溶剂混和物可循环使用约 2 个月。这些条件下基线非常稳定并可高灵敏度探测。

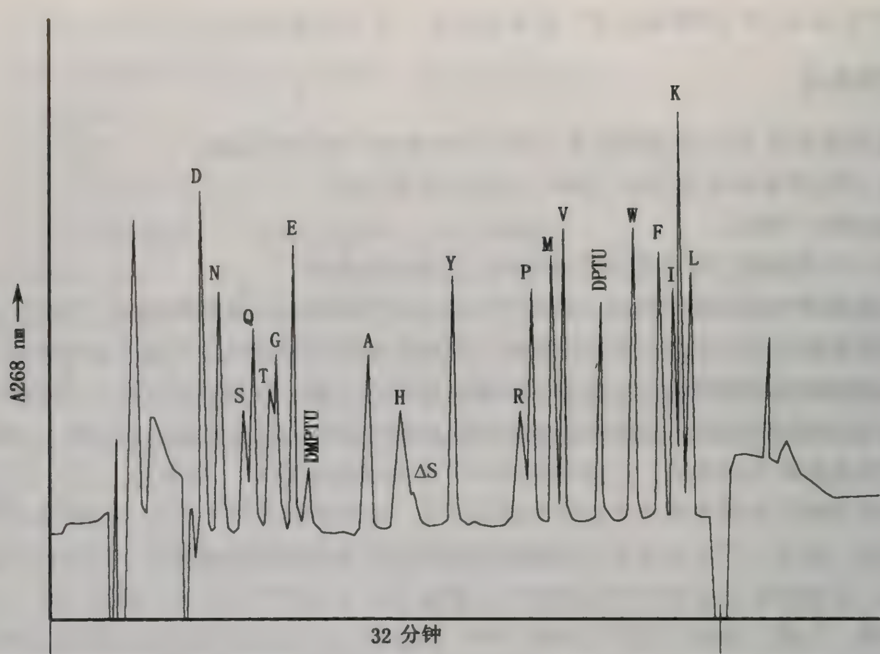


图9.9 典型的 PTH 氨基酸标准层析图（使用 Applied-Biosystem/Perkin Elmer，477A 型测序仪)。每种氨基酸上样 25pmol，据机器手册给出梯度 HPLC 程序。

9.2.5 降解程序

整个过程由程序控制：

- 样品上样前准备过滤器（过滤器洗涤）
- 开始或启动循环，进行样品准备和注入 PTH 氨基酸标准混合物（开始循环）
- 在反应器中（反应器循环）和转化器中（转化器循环）的普通降解循环以及 HPLC 系统在线检测（PTH 检测循环）

一些测序仪有不同的程序控制反应器中（如筒、印迹室或流过式反应器）和转化器中的降解反应，控制释放的 PTH 氨基酸的摄入，它从转化器至探测系统柱的传输以及控制 HPLC 分离（检测程序)。因而，当进行到收集反应器中噻唑啉酮并输送至转化器的阶段时，反应器和转化器的程序必须衔接起来。PTH 氨基酸从转化器输送至在线 HPLC 系统时也是这样，这样的结果是，各个程序的时间必须彼此协调，这样在所有操作循环中，收集事件总是发生在程序的同一阶段。每次测序仪开始运行时，机器计算各个同时运行程序所需的时间并插入一延迟时间（进行氩气或氮气冲洗）以在正确的阶段开始转化和在线探测程序。此类程序用于 Perkin Elmer（Applied Biosystems）测序仪；然而，Berlin 和 Knauer 测序仪的软件在一个程序里同时控制降解、转化和在线探测，这样无需协调最终时间。

过滤器清洗

设计了预循环 （过滤器清洗)，用 polybrene（见前文）准备支持物（玻璃纤维滤膜

或 PVDF 膜)。加入这种化合物后，在一个循环内干燥和清洗过滤器，它包括输送所有的试剂和溶剂使过滤器所有的活性基团被化学试剂饱和，这有助于减小最终层析谱的背景。通常在加样前进行两到三次过滤器冲洗，这意味着反应器在预循环后必须重新打开以加样。

初始循环

典型的初始循环从输运 TFA、用气流干燥和反应器中溶剂洗涤样品开始。与此同时，标准 PTH 氨基酸混合物加入转化器，干燥、溶解于一种适于 HPLC 探测系统进样的适当的溶剂混合物，然后注入 HPLC 检测系统以在降解循环前提供一张典型的标准 HPLC 层析图。通常用 PTH 氨基酸混合物做一实际空白转化以评估氨基酸衍生物的损坏程度。需要标准层析图谱监测机器和校准 PTH 氨基酸量，每种 PTH 氨基酸 25 ~ 50pmol 等分试样送入转化器，50% ~ 80% 注入柱子。常由软件定量，它也控制基线校准和前面循环的扣除（粗略数据对修正数据)。

普通降解程序

反应器(表 9.1)和转化器(表 9.2)的普通降解循环以及在线探测包括偶联、清洗、裂解、噻唑啉酮转入转化器、转化、PTH 氨基酸溶解、转入 HPLC 探测系统以及合适的清洗、反应时间延迟和干燥步骤。在所有这些步骤里氧气必须完全去除，必须当心试剂和溶剂既不能彼此污染(交叉污染),也不能被外物污染或被空气中的氧污染。相应地，所有的试剂和溶剂必须是最高纯度的(测序纯),在惰性气体下装入容器瓶，这些容器必须一直保持在惰性气体中。

表 9.1　筒中的普通降解程序（Procise 测序仪）

筒中循环：筒中脉冲-液体 1

步骤	函数	函数名	时间/温度	洗脱时间
1	258	开始	0	:00
2	137	冲洗输入部件	5	:05
3	11	输送 R2g，筒（顶部）	20	:25
4	140	冲洗大回路（筒）	10	:35
5	6	装入 R1，筒（大回路）	20	:55
6	131	干燥筒（顶部）	30	1:25
7	140	冲洗大回路（筒）	5	1:30
8	135	冲洗筒试剂部件	5	1:35
9	11	输送 R2g，筒（顶部）	170	4:25
10	140	冲洗大回路（筒）	5	4:30
11	6	装入 R1，筒（大回路）	20	4:50
12	131	干燥筒（顶部）	30	5:20
13	140	冲洗大回路（筒）	5	5:25
14	135	冲洗筒试剂部件	5	5:30
15	11	输送 R2g，筒（顶部）	170	8:20

筒中循环：筒中脉冲-液体 1				
步骤	函数	函数名	时间/温度	洗脱时间
16	140	冲洗大回路（筒）	5	8∶25
17	6	装入 R1，筒（大回路）	20	8∶45
18	131	干燥筒（顶部）	30	9∶15
19	140	冲洗大回路（筒）	5	9∶20
20	135	冲洗大试剂部件	5	9∶25
21	11	输送 R2g，筒（顶部）	170	12∶15
22	146	洗大回路（筒）	10	12∶25
23	140	冲洗大回路（筒）	10	12∶35
24	135	冲洗大试剂部件	10	12∶45
25	131	干燥筒（顶部）	60	13∶45
26	142	设置筒温度	48	13∶45
27	53	输送 S2，筒（探头）	25	14∶10
28	257	等待	5	14∶15
29	51	输送 S2，筒（顶部）	5	14∶20
30	257	等待	5	14∶25
31	51	输送 S2，筒（顶部）	5	14∶30
32	257	等待	5	14∶35
33	51	输送 S2，筒（顶部）	5	14∶40
34	257	等待	5	14∶45
35	131	干燥筒（顶部）	30	15∶15
36	63	输送 S3，筒（探头）	15	15∶30
37	257	等待	5	15∶35
38	61	输送 S3，筒（顶部）	5	15∶40
39	257	等待	5	15∶45
40	61	输送 S3，筒（顶部）	5	15∶50
41	257	等待	5	15∶55
42	61	输送 S3，筒（顶部）	5	16∶00
43	257	等待	5	16∶05
44	131	干燥筒（顶部）	60	17∶05
45	111	洗输入部件（S3）	10	17∶15
46	137	冲洗输入部件	30	17∶45
47	140	冲洗大回路（筒）	5	17∶50

筒中循环：筒中脉冲-液体 1

步骤	函数	函数名	时间/温度	洗脱时间
48	26	装入 R3，筒（大回路）	50	18：40
49	30	转运 R3，筒（气体）	5	18：45
50	136	冲洗筒溶剂部件	10	18：55
51	144	清洗筒溶剂部件	10	19：05
52	136	冲洗筒溶剂部件	10	19：15
53	143	清洗筒试剂部件	15	19：30
54	135	冲洗筒试剂部件	30	20：00
55	111	清洗输入部件（S3）	10	20：10
56	137	冲洗输入部件	30	20：40
57	107	洗输出部件（S2）	10	20：50
58	138	冲洗输出部件	30	21：20
59	140	冲洗大回路（筒）	10	21：30
60	146	清洗大回路（筒）	10	21：40
61	140	冲洗大回路（筒）	30	22：10
62	136	冲洗筒溶剂部件	60	23：10
63	257	等待	95	24：45
64	131	干燥筒（顶部）	40	25：25
65	142	设置筒温度	48	25：25
66	127	准备转移到瓶	0	25：25
67	141	冲洗转移管道	5	25：30
68	63	输送 S3，筒（探头）	15	25：45
69	257	等待	20	26：05
70	121	转运到瓶（气体）	30	26：35
71	141	冲洗转移管道	5	26：40
72	53	输送 S2，筒（探头）	25	27：05
73	257	等待	20	27：25
74	121	转移到瓶（气体）	30	27：55
75	128	转移完成	0	27：55
76	53	输送 S2，筒（探头）	25	28：20
77	257	等待	5	28：25
78	131	干燥筒（顶部）	75	29：40
79	259	结束	0	29：40

表 9.2　转化器中的普通降解程序（Procise 测序仪）

瓶循环：瓶	普通 1			
步骤	函数	函数名	时间/温度	洗脱时间
1	258	开始	0	:00
2	235	设置为残基循环	0	:00
3	218	冲洗大回路（瓶）	10	:10
4	173	装人 S4，瓶（大回路）	15	:25
5	213	干燥瓶	10	:35
6	218	冲洗大回路（瓶）	10	:45
7	228	准备接收	1	:46
8	213	干燥瓶	150	3:16
9	236	转化前干燥	80	4:36
10	218	冲洗大回路（瓶）	10	4:46
11	153	装人 R4，瓶（大回路）	20	5:06
12	213	干燥瓶	10	5:16
13	218	冲洗大回路（瓶）	10	5:26
14	173	装人 S4，瓶（大回路）	15	5:41
15	218	冲洗大回路（瓶）	10	5:51
16	257	等待	540	14:51
17	226	装人位置	1	14:52
18	227	准备泵	1	14:53
19	237	转化后干燥（瓶）	200	18:13
20	213	干燥瓶	360	24:13
21	173	装人 S4，瓶（大回路）	15	24:28
22	213	干燥瓶	10	24:38
23	218	冲洗大回路（瓶）	10	24:48
24	173	装人 S4，瓶（大回路）	15	25:03
25	213	干燥瓶	10	25:13
26	218	冲洗大回路（瓶）	10	25:23
27	221	冲洗注人器	80	26:43
28	257	等待	10	26:53
29	238	浓缩样品	5	26:58
30	225	装人注人器	40	27:38
31	171	输送 S4，瓶	15	27:53
32	213	干燥瓶	10	28:03
33	212	发泡瓶	5	28:08
34	215	清空瓶	20	28:28
35	171	输送 S4，瓶	10	28:38
36	213	干燥瓶	10	28:48
37	212	发泡瓶	5	28:53
38	222	冲洗瓶/注人器	40	29:33
39	221	冲洗注人器	40	30:13
40	259	结束	0	30:13

测序仪未来设计

要求测序仪具有最高灵敏度的结果是产生了适于在低皮摩尔范围进行微量测序的机器。由于其高灵敏度，凝胶和印迹上的蛋白质片段的内部测序在世界上许多实验室已成为常规方法。最后，多肽微量测序分析的进一步发展将产生可进行尘摩尔(femtomole)到渺摩尔(attomole)范围内氨基酸测序的新技术。另外，还有几种测定蛋白质和多肽一级结构的其他方法（见下文）。

评　价

部分氨基酸测序可得到有价值的序列信息，这些信息可用于该蛋白质基因定位和序列测定，因此促进了最终从基因导出氨基酸序列。然而，必须指出的是，该信息并不足以完全描述蛋白质的一级结构！序列是否真正地开始和终止于导出序列，如有无 N 末端甲硫氨酸表达，以及是否正确划分了阅读框架并不确定。还有，位点的修饰，如糖基化或磷酸化，并不能从核苷酸序列导出。为了确定这些修饰以及它们的功能含义，必须通过直接蛋白研究来分离、纯化和鉴定蛋白质。获得序列信息的组合方法如下：

遗传方法

- 部分 N 末端或内部氨基酸测序
- 选择合适的寡聚核苷酸探针
- 与基因组 DNA 杂交
- 蛋白质基因定位
- 基因克隆和测序
- 从基因序列导出完整的氨基酸顺序
- 检查正确的开放阅读框架

氨基酸直接测序分析

- N 末端序列分析；
- 裂解蛋白质产生用于内部测序的肽段
- 肽的纯化
- 肽 N 末端序列分析
- 用其他酶进一步裂解
- 几组肽段的分离和序列分析
- 序列排布
- 确定 S-S 键
- 检查修饰情况

质谱序列分析

- 电喷雾质谱（ES-MS）
- 基质辅助激光解吸质谱（MALDI-MS）

自发展 ES-MS 和 MALD-MS 技术以来，蛋白质和肽的质谱变得日益重要，两种技术都可用于蛋白质和肽的质量测定(见第 19 章)。近来，这些技术，与 N 末端和内部氨基酸测序相结合，可用于在高分辨双向电泳后鉴定蛋白质突变体和来自恶性组织或组织活体的与肿瘤相关的蛋白质，比如心肌(Jungblut et al. 1994)。这些新方法激励着蛋白质研究领域的新进展。这些技术直接集中于研究细胞内蛋白，是 DNA 研究一个重要补充。

由于序列数据量的增加和蛋白质分析技术的重大进步（高分辨 2DE、HPLC 层析、N 末端和内部 Edman 技术与质谱法），使发育生物学和分子医学的更深入研究成为可能。当前热点课题包括：

• 组织比较
• 临床标记的确定
• 多基因改变
• 评估翻译后修饰在疾病中的作用

（李　民 译　陈常庆 校）

参考文献

Braunitzer G, Gehring-Müller R, Hilschmann N, Hilse K, Hobom G, Rudloff V, Wittmann-Liebold B (1961) The structure of adult normal human hemoglobin. Biol Chem Hoppe-Seyler 325: 283–286

Canfield R (1963) Peptides derived from tryptic digestion of egg white lysozme. J Biol Chem 238: 2698–2707

Chang JY, Creaser EH (1976) A novel manual method for protein sequence analysis. Biochem J 157: 77–85.

Edman P (1950) Acta Chem Scand 4: 283

Edman P, Begg G (1967) A protein sequenator. Eur J Biochem 1: 80

Edman P, Henschen A (1975) Sequence determination. In: SB Needleman (ed) Protein sequence determination. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 232–279

Edmundson AB (1965) Amino acid sequence of sperm whale myoglobin. Nature 205: 883–887

Fischer S, Reimann F, Wittmann-Liebold B (1989) A new modular sequencer. In: B. Wittmann-Liebold (ed), Methods in protein sequence analysis. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 98–107

Fraenkel-Conrat H., Harris JI, Levy AL (1955) in: Methods in biochemical analyis, vol. 2, p, 393

Gray WR, Hartley BS (1963) A fluorescent endgroup reagent for proteins and peptides. Biochem J 89: 59

Harris JI, Lerner AB (1957) Amino acid sequence of the α-melanocyte-stimulating hormone. Nature 179: 1346–1347

Harris JI, Roos P (1956) Amino acid sequence of a melanophore-stimulating peptide. Nature 178: 90

Herfurth E, Hirano H, Wittmann-Liebold B (1991a) The amino acid sequence of the *Bacillus stearothermophilus* ribosomal proteins S17 and S21 and their comparison to homologous proteins of other ribosomes. Biol Chem. Hoppe-Seyler 372: 955–961

Herfurth E., Pilling U, Wittmann-Liebold B (1991b) Microsequencing of proteins and peptides in the Knauer sequencer with and without covalent attachment to polyvinylidene difluoride membranes by the wet-phase degradation technique. Biol Chem Hoppe-Seyler 372:351–361

Hewick RM, Hunkapiller MW, Hood LE, Dreyer WJ (1981) A gas liquid solid phase peptide and protein sequencer. J Biol Chem 256: 7990–7997

Hewick RM, Hunkapiller MW, Hood LE, Dreyer WJ (1981) A gas liquid solid phase peptide and protein sequencer. J Biol Chem 256: 7990–7997

Jungblut P, Otto A, Zeindl-Eberhart E, Pleißner KP, Regitz-Zagrosek V, Fleck E, Wittmann-Liebold B (1994) Protein composition of the human heart: the construction of a myocardial two-dimensional electrophoresis database. Electrophoresis 15:685–707

Keil B, Prusik Z, Sorm F (1963) Disulphide bridges and a suggested structure of chymotrypsinogen. Biochim Biophys Acta 78: 559–561.

Laursen RA (1971) General description of original sequencer and preparation of polystyrene. Eur J Biochem 20: 89–102.

Laursen RA (1977) Coupling techniques in solid-phase sequencing. Meth Enzymol 47: 277–288

Li CH, Geschwind II, Cole RD, Raacke ID, Harris JI , Dixon JS (1955) Amino acid sequence of alpha-corticotropin. Nature 176: 687–689

Machleidt W, Wachter E, Scheulen M, Otto J (1973) Coupling proteins to aminopropyl glass. FEBS Lett. 37: 217–220

Margoliash E, Smith EL, Kreil G, Tuppy H (1961) Amino acd sequence of horse heart cytochrome C. Nature 192: 1121–1127

Rudloff V, Braunitzer G (1959) Ein Verfahren zur präparativen Gewinnung natürlicher Peptide, die Isolierung der tryptischen Spaltprodukte von Humanhämoglobin A über Dowex 1X2 unter Verwendung flüchtiger Puffer. Biol Chem Hoppe-Seyler 323: 129–144

Pappin DJC, Hojrup P, Bleasby AJ (1993) Rapid identification of proteins by peptide mass fingerprinting. Curr Biol 3:327–332

Sanger, F, Thompson EOP (1953) The amino acid sequence in the glycyl chain of insulin. Biochem J 53: 353–374

Shelton JR, Schroeder WA (1960) Further NH2-terminal sequences in human hemoglobin A, S and F by Edman's phenylisothiohydantoin method. J Am Chem Soc 82: 3342

Smyth DG, Stein WH, Moore S (1963) The sequence of amino acid residues in bovine pancreatic ribonuclease: revisions and confirmations. J Biol Chem 238: 227–234

Spackman DH, Stein WH, Moore S (1958) Anal Chem 30: 1190.

Wittmann-Liebold B (1992) High sensitive protein sequence analysis. Pure and Appl Chem 64: 537–543

Wittmann-Liebold B (1986a) Design of a multipurpose sequencer. In: JE Shively (ed), Methods in protein microcharacterization. Humana, Clifton, NJ, pp 249–277

Wittmann-Liebold B (1986b) Practical methods for solid-phase sequence analysis. In: A. Darbre (ed) Practical protein chemistry: a handbook. Wiley, pp 375–409

Wittmann-Liebold B (1981) Microsequencing by manual and automated methods as applied to ribosomal proteins. In: TY Liu, AN Schechter, RL Heinrikson, PG Condliff (eds) Chemical synthesis and sequencing of peptides and proteins. Elsevier, Amsterdam, pp 75–110.

Wittmann-Liebold B, Ashman K (1985) The use of on-line high performance liquid chromatography for phenylthiohydantoin amino acid identification: In: H. Tschesche, (ed) Methods of protein chemistry. Walter deGruyter, Berlin, p 303

Wittmann-Liebold B, Graffunder H, Kohls H (1976) A device coupled to a modified sequenator for the automated conversion of anilinothiazolinones into PTH-amino acids. Anal Biochem 75: 621–633

Wittmann-Liebold B, Wittmann HG (1963) Die primäre Proteinstruktur von Stämmen des TMV: Aminosäuresequenzen des Proteins des TMV-Stammes Dahlemense. Z. Vererbungslehre 94: 427–435

Zimmermann CL., Appella A, Pisano JJ (1977) Rapid analysis of amino acid phenylthiohydantoins by high performance liquid chromatography. Anal Biochem 77: 569–573

第 10 章

DABITC/PITC 法手工测定蛋白质序列

T. Choli-Papadopoulou，Y. Skendros，K. Katsani

10.1 引 言

基于 Edman 降解技术的多肽微量测序可用手工或自动方法进行（Edman and Begg 1967；Edman and Henschen 1975）。降解包含三个部分：4－N，N′-二甲氨基偶氮苯-4－异硫氰酸酯/异硫氰酸苯酯（DABITC/PITC）与肽链的偶联，肽链上第一个氨基酸以苯噻唑啉酮形式裂解下来并异构化为更稳定的苯乙内酰硫脲。稳定的衍生物可用聚酰胺薄膜（Edman and Henschen 1975）或高压液相层析（HPLC）鉴定（Chang 1988）。

与其他分析方法一样，手工测序这些年来在速度和灵敏度上都有了很大的进展。灵敏度的改善主要得益于装备的革新，尤其是 HPLC，它在肽谱图测定、肽纯化以及氨基酸衍生物分析方面引起了一场小的革命。这些进展的某些方面也得益于化学的发展——催化剂选择和小反应器具的应用以减少干燥时间，还得益于处理程序的简化以及将仪器所必须部件集中于一个工作站内。灵敏的手工测序仍可使用 PITC，但在这种情况下需要使用 HPLC 检测系统来检测释放的苯乙内酰硫脲。通常反应所产生的 UV 阳性的副产物会污染衍生物从而干扰薄膜层析的检测认定。

同时，手工测序方法使用异硫氰酸盐类似物，允许用肉眼检测释放的氨基酸。DABITC 被广泛地应用于手工液相或固相的微量测序（Wittmann-Liebold and Kimura 1984）。Chang 等在 1976 年报道了该试剂，它与通常采用 PITC 的降解方法相比有几个优点：首先，它所释放的氨基酸乙内酰硫脲为红色的衍生物，在聚酰胺膜上皮摩尔（pmol）量级即肉眼可见；其次，Edman 化学法的副产物形成蓝色的成分容易与深红色的氨基酸乙内酰脲分开。真正的 DABTH（4－N，N′-二甲氨基偶氮苯-4－乙内酰硫脲）衍生物在 HCl 染色后呈现红色，如上所述，但也出现形成红色、蓝色、紫色斑点的其他衍生物。

DABITC 有一个缺点即由于 DABITC 试剂有庞大的侧边基团，其偶联产率比 PITC 低（Chang et al. 1978）。自从引入 DABITC/PITC 双偶联法以来，该方法已得到广泛的应用：

- 它易于操作，不需要高级的装备，可用于任何实验室。
- 可进行批量处理，对 HPLC 组分的筛选和鉴定特别有利。
- 它可有效地测定小肽的序列。
- 它在处理肽方面提供了很大的灵活性，包括偶尔使用特殊的程序和与方法的改进同步。
- 材料容易处理，该方法可用于分离的蛋白质或片段的纯度试验。

该方法可用于 1~5 纳摩尔的肽或蛋白质，在适当改进后，可适用于皮摩尔的量级。即使是微量的肽，也不一定要求使用高级的 HPLC 系统。

鉴定可快速而简单地在邮票大小的薄膜上进行（Chang and Creaser 1977）；同时，也发展了对鉴定的氨基酸进一步确认及定量分析的 HPLC 系统（Chang 1988；Lehmann and Wittmann-Liebold 1984）。

10.2 方法的说明

设 备

这里描述的手工方法不需要昂贵的设备，但下面的装置可使测序更加灵敏和易于操作。最合适的装置是一个比如 1 米长带有护罩的实验桌。它应配备下列物品：

— 通过一段塑料输出管连接一个吸管的氮气罐，吸管可用活塞关闭
— 适用于 Edman 管的台式离心机（如 Labofuge I，Christ，Heraus，Osterode，德国）
— 真空设备（泵、冷却器或 KOH 过滤器，同时具有 2~6 个干燥器，真空表和传感器）
— 一个或两个铝加热器，它带有可紧紧插入 Edman 管和转化瓶的孔
— Edman 玻璃管：4.5cm 长，内径 8mm，有玻璃塞；或 2.5cm 长，内径 2~4mm
— 转化瓶：5cm 长，内径 4mm
— 能装入干燥器的可支持 10~20 个瓶子的塑料托架
— 自动移液管（2，5，10，20，50，100 和 200μl）
— 薄膜层析物品：2~4 个磨光底的玻璃烧杯（25ml，高 5cm），有一层 Parafilm 可封住烧杯的玻璃盖，玻璃毛细管，聚酰胺膜（2.5cm × 2.5cm），镊子，10 张 2.5cm × 2.5cm 膜的托架，冷风扇
— 用来鉴别 DABTH-衍生物的等梯度（Lehmann and Wittman-Liebold 1984）或梯度（Chang 1988）HPLC 系统
— 从沸腾的丙酮(Pro 分析纯,用分子筛干燥过)中重结晶的 DABITC（Fluka，Buchs，Switzerl 或 Pierce）。溶解 1g 于 70ml，经过一层滤纸并使之慢慢冷却：得到 0.7g 棕色针状物，沸点为 169~170℃
— 测序纯的三氟乙酸(TFA)
— 测序纯的 PITC
— Pro 分析纯的吡啶（Merck，Darmstadt，德国），依次用 KOH 片、茚三酮和 KOH 重蒸馏，其沸点 114~116℃
— 水：两次玻璃重蒸馏并新鲜配制
— 下列试剂必须是测序纯或 Pro 分析纯，并不需进一步提纯即可使用。
— n-正庚烷
— 乙酸乙酯
— n-乙酸丁酯
— 醋酸
— 甲苯
— n-正己烷

— 丙酮

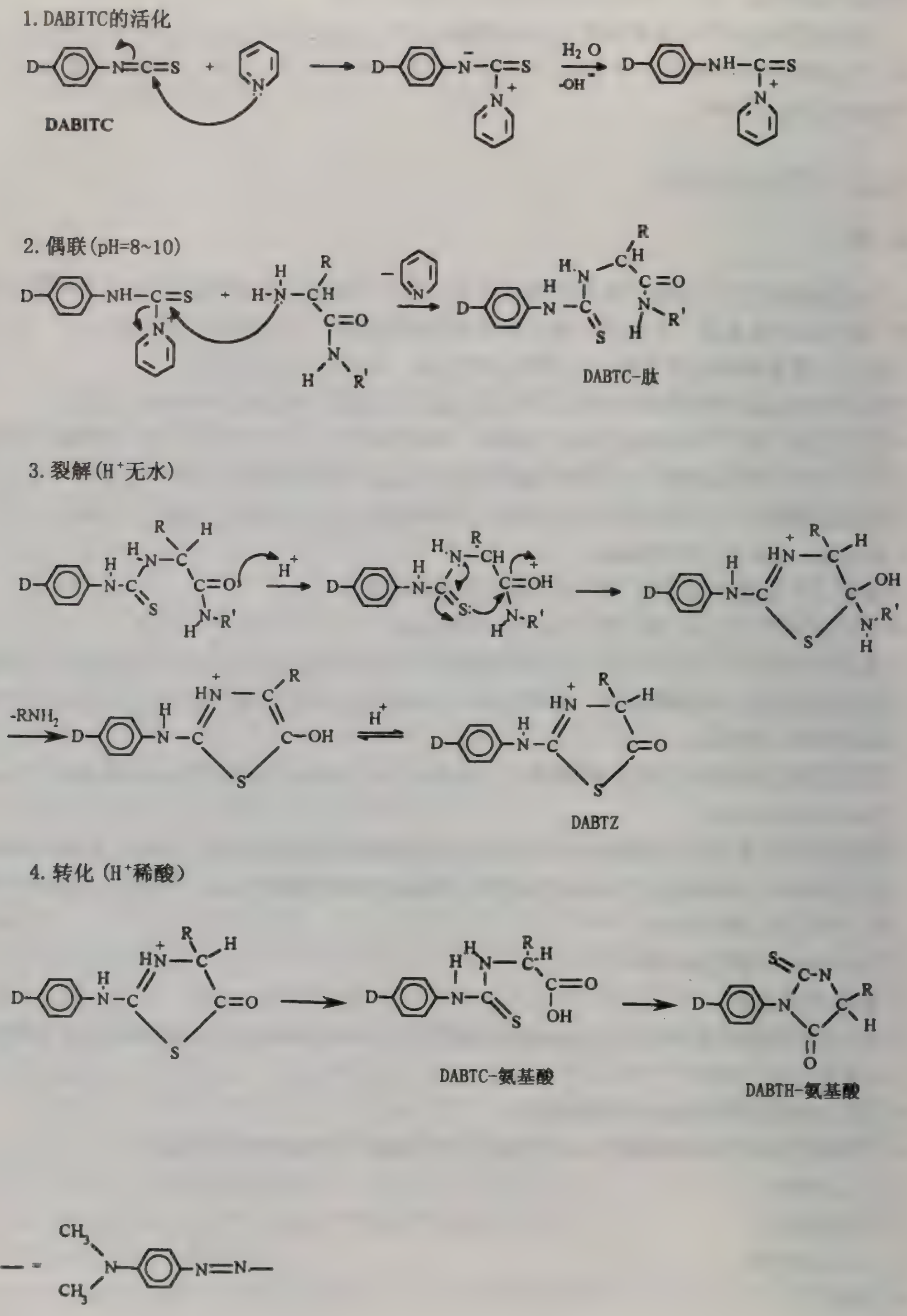


图 10.1　用 DABITC/PITC 降解的反应过程

用 DABITC/PITC 降解的反应过程如图 10.1 所示。在碱性条件下（pH = 8 ~ 10）偶联生成二甲氨基偶氮苯-硫代氨甲酰肽（DABTC -肽）。裂解反应在无水强酸存在下进行并以二甲氨基偶氮苯噻唑啉酮衍生物（DABTZ 氨基酸）方式释放第一个氨基酸。抽提后，该衍生物可转化为更稳定的二甲氨基偶氮苯乙内酰硫脲，它可在 HCl 蒸汽中生成红色的产物。

10.3 实验步骤

10.3.1 微量测序的肽和蛋白质的预处理

多肽的分离

- 一般要求摩尔数高于 80% 的纯度，但偶尔需要更高的纯度或在低的纯度下也可测序。纯度应该用两种系统检验（HPLC 和 PAGE）。
  样品应该是无盐的以确保在与（DABITC/PITC）偶联时有一个正确的 pH 值。如有必要，可用 C_8 或 C_{18} 柱对蛋白质或肽脱盐，并小心干燥以去除痕量的酸。
- 蛋白质常能用丙酮或三氟乙酸从盐和不良的缓冲液组分（如 10% 甘油）中沉淀下来，但这个方法并不确保可行。

待降解样品的准备

1) 只要无盐和洗涤剂，小肽不需要进一步处理，只需重新溶解在少量含水醇或稀酸中；取 5 ~ 20μl(1000 ~ 2000 pmol)加入测序管并干燥。
2) 大的纯肽重新溶解在 88% 的甲酸中，移入测序管中并干燥。
3) 许多蛋白质可从浓缩的水溶液中用 1 ~ 3 倍体积的丙酮或从甲酸/乙酸乙酯中沉淀，因此可除去样品中的盐或洗涤剂。
4) 电洗脱 – 电渗析样品的乙醇沉淀。
4a) 将冻干的样品溶解于 50μl 双蒸水中。
4b) 在进一步实验前，放大检验是否所有固体材料都已溶解于溶液中。
4c) 加入 450μl，– 20℃的乙醇，混合溶液并贮存于 – 20℃ 4 ~ 18 小时。
4d) 通过一种摇摆桶转子或一种固定角度转子离心机压缩上述材料，使用前者离心后有较小的分布区域，从而改善沉淀的可见性。
4e) 样品的重新溶解是个问题，因为大多数 SDS 已在沉淀进程中除去。由于溶液要保持尽可能小的体积，所以加入 80μl 50% 吡啶水溶液并检验样品的溶解性。如果不溶，加入 1μl 10%SDS 再检查一次可溶性。
5) 在即将使用前将样品转移到 Edman 管中，最好在用于降解的试管中进行干燥以避免样品的转移丢失。
6) 避免把肽在真空中保存超过数小时。
7) 加入重蒸水或乙醇重复真空干燥，以除去样品中的痕量酸。

10.3.2 手工液相 DABITC/PITC 双偶联方法

此方法针对 2~5nmol 或 500pmol 至 1nmol（在圆括号内）的肽或蛋白质。降解在小的玻璃塞管（Edman 管，长 4.5cm，内径 8mm）或在短的丹酰玻璃管中（长 2.5cm，内径 4mm）进行。试剂和溶剂的纯化见 10.2.2 部分。

偶　联

1) 在真空度为 100~200 毫托装有 KOH 颗粒的干燥器中干燥装在 Edman 管（或丹酰管）中的肽或蛋白质；如果是从酸溶液中纯化的则应重复干燥。
2) 加入 80μl（20μl）溶于重蒸水中的 50%吡啶。
3) 充入氮气或氩气冲洗。
4) 加入100倍过量的 DABITC（分子量282），它溶于吡啶中，比如150μg/40μl（30μg/10μl）。
5) 充入惰性气体冲洗，用玻璃塞封住管口（如用丹酰管则用 Parafilm）。
6) 在铝加热器内 52℃保温 30~40 分钟。
7) 加入 10μl（2μl）浓缩的 PITC。
8) 充入惰性气体清洗，封住管口。
9) 在 52℃保温 20 分钟。

偶联后的洗涤

1) 加入 400μl（100μl）n-正庚烷/乙酸乙酯（2：1，v/v），重复 2 至 3 次。
2) 用台式离心机 Labfuge I（Heraeus/christ，ostericode，德国）离心 2 分钟或用微量离心管（Eppendorf tube）作为支持物在 Microfuge B 离心机（Beckman，Berkley，CA，美国）离心 2~3 秒，可见清晰分相。
3) 用一水泵将上层液相回收至清洁的空废液瓶中，如样品只是一个小的疏水肽可以贮存。万一多肽在界面沉淀，回收就要特别小心。
4) 在真空度为 100 毫托真空干燥器中干燥水相 15~20 分钟。在样品未完全干燥前不要进行裂解反应；如果必要的话，加入 40μl（10μl）乙醇重复真空干燥样品。

裂　解

1) 加入 50μl（10μl）无水 TFA。
2) 充入惰性气体清洗，用盖子封口。
3) 在 52℃保温 10 分钟。
4) 用 KOH 颗粒真空干燥器在真空度 100 毫托干燥。
5) 假使样品中含有重复的 Val，Pro，Ile 残基，重复裂解 1~3 次。
6) 如果样品未完全干燥，加入 50μl（10μl）n-醋酸丁酯重复干燥。

噻唑啉酮衍生物的抽提

1) 加入 30μl（30μl）水和 100~200μl（30μl）n-醋酸丁酯。

2) 充入惰性气体清洗。
3) 涡旋并在 Labofuge I 台式离心机离心 2 分钟（在 Microfuge B 离心机离心 3~5 秒，Beckman，Berkley，CA，USA）。
4) 回收含噻唑啉酮衍生物的上层至一个小玻璃管(长5cm,内径4mm)(或长2.5cm,内径4mm)。
5) 重复抽提并真空干燥化合的提取物。
6) 在真空度为 100 毫托真空干燥器中用 KOH 颗粒干燥含有残余小肽的水相并开始下一轮降解循环。

转化为 DABTH-氨基酸衍生物

1) 向干燥的醋酸丁酯抽提物中加入 40μl（10μl）40%TFA 水溶液。
2) 充入惰性气体清洗，用 parafilm 封口。
3) 在 52℃保温 30 分钟。
4) 真空干燥。

鉴　定

在双向聚酰胺薄膜上分离 DABTH-氨基酸衍生物的图谱见图 10.2。

1) 将 DABTH-氨基酸溶于 2μl（<0.5μl）乙醇中。
2) 取大约 1/20（1/2~1/5）加到 2.5cm×2.5cm 的聚酰胺膜上，斑点大小 1mm；加入一滴标记物（见下文）。
3) 膜片双向展开:第一向:33%的醋酸水溶液;第二向:甲苯/正己烷/乙酸（2∶1∶1;v/v）。
   注意：在即将使用前才将第二向溶剂加入烧杯之中。
4) 重复添加适量的样品，标准 DABTH-氨基酸与待检测的 DABTH-氨基酸共同移动。
5) 如要定量，或者在 DABTH 氨基酸的区分存在疑问时（比如 DABTH-Ile/Leu 的区分），可将剩余的 DABTH-氨基酸加入反相 C_{18} HPLC 柱（图 10.3）。

标记物的准备

1) 吸取 500μl 50%吡啶置于玻璃塞试管中。
2) 加入二乙胺和乙醇胺各 30μl (两者均重蒸馏过)。
3) 充入氮气冲洗。
4) 加入 250μl DABITC 到 100%吡啶中 (2.3mg/ml 吡啶)。
5) 充入氮气冲洗，用塞子封口。
6) 在 52℃保温 1 小时。
7) 真空干燥。
8) 溶于 1ml 乙醇。
9) 取一小滴标记物和样品加在聚酰胺膜上。在层析后可见两个很弱的蓝色标记物斑点。

10.3.3　DABTH-氨基酸衍生物的鉴定

薄层技术

1) 用裁纸刀裁下 2.5cm×2.5cm 大小的聚酰胺薄膜（从 Schleicher and Schuell 购买）并放

入密封盒内，用自制的薄玻璃毛细管上样。

2) 在膜上加入标记物（见上述），并使斑点尽可能最小（距边缘 4mm）。

3) 在 2～5 μl 乙醇中溶解 DABTH 衍生物，并在标记物的上方点部分样品。

4) 先在第一个方向上展开膜片 4～5 分钟（33%醋酸水溶液）；当溶剂前沿距膜顶 2mm 时，从烧杯中移去 TLC（薄层层析）膜。用冷风吹干 5 分钟。

5) 在第二个方向展开膜片 2 分钟（甲苯/正己烷/醋酸，2∶1∶1，v/v）。当前沿到达顶端

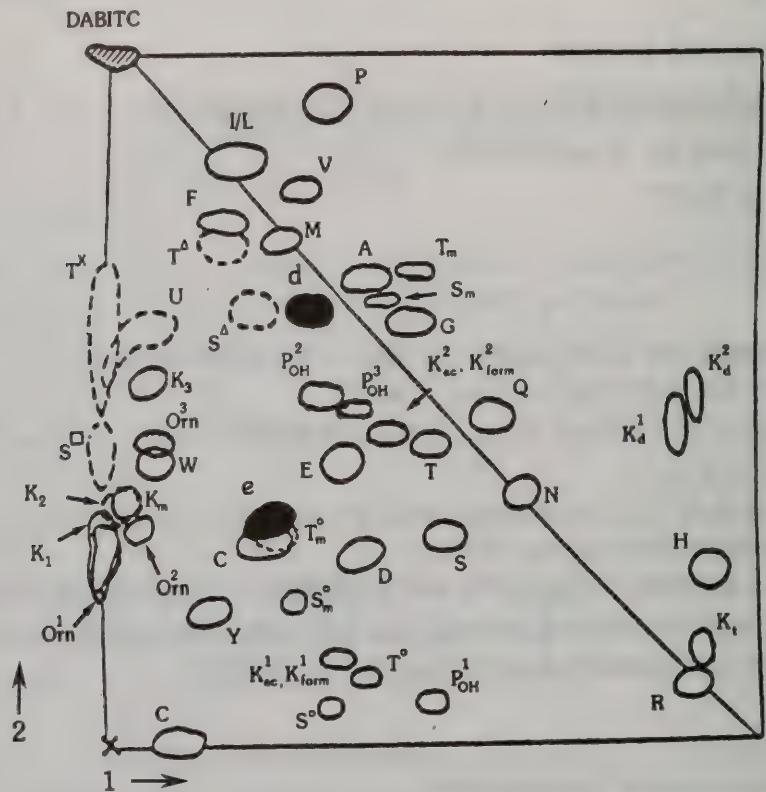


图 10.2　双向聚酰胺薄层膜上分离 DABTH 氨基酸衍生物。符号注解：DABTH 氨基酸衍生物：A，丙氨酸；C，磺基丙氨酸；Cm，羧甲基半胱氨酸；D，天冬氨酸；E，谷氨酸；F，苯丙氨酸；G，甘氨酸；H，组氨酸；I，异亮氨酸，K1，α-DABTH-ε-DABTC 赖氨酸（红色）；K2，α-PTH-ε-DABTC 赖氨酸（蓝色）；K3，α-DABTH-ε-PTC 赖氨酸（蓝色）；Kac1，乙酰基水解后的 α-DABTZ-Nε-乙酰-L 赖氨酸(蓝色)；Kac2，α-DABTH-Nε-乙酰-L 赖氨酸（红色）；Kform1，甲酰基水解后的 α-DABTZ-Nε-甲酰-L 赖氨酸（蓝色）；Kform2，α-DABTH-Nε-甲酰-L 赖氨酸（红色）；Km，Nε-甲酰-L 赖氨酸的衍生物；Kd1，Nε-二甲酰-L 赖氨酸的衍生物；Kd2，Nε-二甲酰-L 赖氨酸的衍生物；Kt，Nε-三甲酰-L 赖氨酸的衍生物；L，亮氨酸；M，甲硫氨酸；N，天冬酰胺；O1，α-DABTH-ε-DABTC 鸟氨酸；O2，α-PTH-ε-DABTC 鸟氨酸；O3，α-DABTH-ε-PTC 鸟氨酸（蓝色）；P_{OH}1，DABTZ-4-羟基-脯氨酸（蓝色）；P_{OH}2，4-羟基-脯氨酸（红色）；P_{OH}3，水解后的 4-羟基-脯氨酸（红色）；Q，谷氨酰胺；R，精氨酸；S，丝氨酸；S-Δ，脱氢丝氨酸（蓝色）；S^*，丝氨酸聚合物；S°，DABTZ 丝氨酸（蓝色）；S_m，o-甲基-L-丝氨酸；S_m°DABTZ-o-甲基丝氨酸（蓝色）；T，苏氨酸；TΔ，脱氢苏氨酸；T°，DABTZ-苏氨酸（蓝色）；Tx，蓝色的聚合苏氨酸产物；Tm，o-甲基-L-苏氨酸；T_m°，DABTZ-o-甲基-L-苏氨酸（蓝色）；U，硫脲衍生物；V，缬氨酸；W，色氨酸；Y，酪氨酸；d 和 e，蓝色的与 DABTC 反应的二乙基胺和乙醇胺参照标记物。

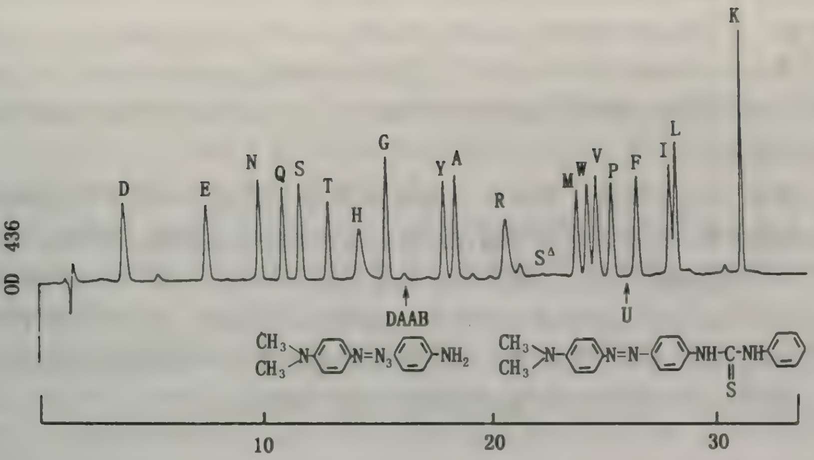


图 10.3　按照 Chang (1988) 方法分离所有 DABTH 氨基酸的层析图。层析条件：柱，spherisorb ODS-2.5μm，4.6mm×12.5cm。溶剂 A 为 35mmol/L 醋酸缓冲液（pH5.0）。溶剂 B 为乙腈。梯度为 25 分钟内从 36% 到 60%B，25 到 26 分钟从 60% 到 80%B，在 26 到 32 分钟保持 80%B，然后在 32 到 34 分钟从 80% 退至 36%B。检测器设定为 436nm，0.004AUFS。

4～5mm 时，移去膜片，冷风吹干。

6) 在护罩下将聚酰胺膜放入 HCl 蒸汽中（12mol/L HCl）。与参比 DABTH-氨基酸混合物相比较鉴定红色斑点，并测定与蓝色标记物的相对迁移（见图 10.2）。

7) 确认 DABTH 氨基酸和附加斑点（也见 10.5 部分）。

图 10.2 表示了 DABTH-氨基酸衍生物在邮票大小的聚酰胺膜上层析的分离结果（与二维层析试剂的相关的溶剂混合物的细节见 10.5 部分）。单个衍生物的定位是通过 2 个标记物即与 DABTC 作用的二乙基胺和二乙醇胺的迁移来决定（见上文）。释放的 DABTH-氨基酸衍生物暴露在酸蒸汽中产生红色斑点，而标记化合物只形成蓝色斑点。DABTH-氨基酸衍生物在微聚酰胺膜上的检测限大约 20pmol。

HPLC 分离 DABTH-氨基酸衍生物

DABTH-氨基酸衍生物可在 HPLC 上用Chang(1988)提出的梯度系统进一步鉴定。用 ODS-2 柱，5μm，4.6mm×12.5cm。溶剂 A 为 35mmol/L 醋酸钠缓冲液（pH5.0），溶剂 B 为乙腈。所用梯度为在 25 分钟内从 36% 至 60% 溶液 B，在25 至 26 分钟从 60% 至 80% 溶剂 B，在 26 至 32 分钟保持 80% 溶剂 B，在 32 至 34 分钟从 80%B 返回。在 436nm 检测，0.004AUFS。

10.4　问题解答

盐一般地要尽量避免因为它会降低异硫氰酸与多肽的偶联产率（偶联反应的 pH 应调至 pH9.0）。一种较低的 pH 会阻碍主要是 His 与 Lys 残基获得足够的偶联产率。肽的

进一步盐污染会使偶联和裂解阶段后的样品干燥变慢。由于盐会干扰薄膜上氨基酸衍生物的最佳分辨，并主要发生在碱性 DABTH 衍生物 DABTH-Arg 和 DABTH-His 区间内，所以有必要在开始时对降解所需多肽进行无盐制备和确保在裂解和偶联阶段后除去碱和酸。Leu 和 Ile 的衍生物在聚酰胺薄膜层析中难以区分，但用本章提出的 HPLC 梯度系统可将二者很好地分离。

在加入强酸 TFA 的裂解过程和在 Edman 降解的干燥过程中会产生 DABTH-Ser 和 DABTH-Thr 的脱水物。这些脱水物可通过选择合适的转化介质消除。但没有一种转化介质适用于所有不同的噻唑啉酮。1mol/L HCl 非常适合于转化 Ser 和 Thr 噻唑啉酮，而稀的 TFA 更适合于 Asp 和 Glu 衍生物的异构化。在用 HCl 转化时，这些化合物将产生大量的自由酸乙内酰硫脲。所以可以依据不同肽的氨基酸组成从一种转化介质变换为另一种转化介质，或用另一种转化介质对相同的肽进行第二次降解。

10.5 疑难解析

试剂的稳定性

所有的反应必须在氮气中进行有如下原因：一旦偶联发生，DABTC 蛋白质易于脱硫。空气中的氧会取代硫从而阻止环化和裂解，导致产率下降。PITC 长时间暴露在光线下会进行降解，必须在 -20℃的氮气或氩气中保存。

因为 DABITC 在有机相中的有限溶解性会阻止 DABITC-肽摩尔比的增加，N 末端基团与 DABITC 的定量偶联只能在极端条件下实现（75℃，1.5 小时）。高温加速了 DABITC 的水解，并会导致一些不需要的副反应。而用 DABITC-PITC 双偶联的方法可使大量偶联在一个合适的温度下实现（52℃ ~ 55℃）。由于 DABITC 在吡啶中不十分稳定，最好在每天或每个降解循环新鲜制备。

盐的存在

从 SDS 胶通过电洗脱-电渗析或其他程序回收的样品在测序前必须去除污染的盐并染色。基于蛋白质不溶于 -20℃ 高浓度有机溶剂中的沉淀法很容易做到这一点（见上述“降解样品的准备”）。盐的存在会使 DABTH-His 和-Arg 区域的斑点扩大：将 DABTH-氨基酸在氮气中干燥，加入 50μl 水并用乙酸丁酯重新抽提衍生物，盐会留在水相里。

抽提步骤

在抽提步骤中可去除一些杂质，它们能阻止后续反应或能形成可干扰 DABTH -氨基酸层析的副产物。正庚烷和乙酸乙酯的混合物可以去除大部分这类杂质。过度的抽提会引起一些小肽和疏水肽抽提损失。当心由于疏水肽沉淀而形成的有机相和水相中的肽层。小心移去上层溶剂；移液时不要碰管中的沉淀。

用庚烷和乙酸乙酯两次抽提会洗去 97% ~ 98% 的多余试剂和副产物。然而由于痕量有机相去除不完全，而有机相会干扰后续 DABTH -氨基酸的鉴定，因此当 DABTH -氨基酸产率很低的时候，建议进行第三次洗涤。在这第三次提取过程中 C 端的 Lys 可能会丢失，然而这个氨基酸可在 DABTZ（二甲基氨基偶氮苯噻唑啉酮）氨基酸抽提后通过水

相的红色来鉴别。

鉴定 DABTH-氨基酸衍生物

如果在聚酰胺层析中产生“双点”，这表明噻唑啉酮转化为乙内酰硫脲衍生物的反应不完全。这种情况下，需检查铝加热器的温度和试剂管在加热器中是否插紧。如果必要的话，可用铝箔使试管更紧地置于加热器孔中。

若问题仍然存在，则可增加转化时间，提高转化温度，或改变转化介质（20% TFA 水溶液，40% TFA 水溶液，1mol/L HCl，溶于乙酸乙酯的 40% TFA，甲醇盐酸，在 HCl 蒸汽中饱和的醋酸）。

氨基酸衍生物的副产物被认为是从反应中间产物衍生而来的，这些中间产物可能与（或者就是）DABTC 或 DABTZ 衍生物有关。据报道这两者在聚酰胺膜上暴露于 HCl 蒸汽后会显蓝色。尽管有某种程度上依赖于化学试剂和条件而有所不同，在常规的降解过程中一般都会在一定范围内观察到二级斑点（Bahr-lindstrom et al.1982）。

鉴定疏水氨基酸衍生物（DABTH-Ile/Leu，DABTH-Val/Phe）的困难

Ile 和 Leu 可通过硅板或 HPLC 来区分（见上述“DABTH 氨基酸的 HPLC 分离”）。另外由于它们有不同的副产物，因此也可在聚酰胺薄膜上区分（Bahr-Lindstrom et al.1982）。可用上述方法鉴定 Phe 和 Val 的 DABTH 衍生物。

DABTH-Ser 和 DABTH-Thr 的鉴定问题

加入 1mol/L HCl 或 HCl 饱和的醋酸作为转化介质。

假定由于脱酰胺基引起的 DABTH-Asn 和 DABTH-Gln 双点

用 20% ~ 40% TFA 水溶液作为转化介质以防止酸的形成。

附加点的鉴定，包括一些翻译后修饰的氨基酸（Tsiboli et al.，手稿；见图 10.2）。

10.6 结　论

DABITC/PITC 测序方法简单，灵敏而且省钱。一轮降解循环需要约 140 分钟，不需特殊设备和放射性材料，因而是肽和蛋白质微量序列分析的普遍适用的方法。通过一次聚酰胺 TLC 鉴定足以区分所有普通氨基酸和一些修饰的氨基酸（它们的 DABTH 衍生物），Leu 和 Ile 是例外（见 10.5）。利用红色的 DABTH-氨基酸衍生物和它们有时出现的蓝色或紫色副产物衍生物，会使鉴定简便易行。

与 dansyl-Edman 技术相比，该方法既适用于大蛋白质也可用于小肽；因而可以用于检测蛋白质或肽（例如经过 HPLC 纯化）的纯度。

（朱学勇 译　施蕴渝 校）

参考文献

Bahr-Lindstrom H, Hempel J, Jornvall H (1982) J Prot Chem 1: 257-262
Chang JY (1988) Anal Biochem 170: 542-556
Chang JY, Creaser EH, Bentley KW (1976) Biochem J 153: 607-611
Chang JY, Creaser EH (1977) J Chromatogr 132: 303-307
Chang JY, Braner D, Wittmann-Liebold B (1978) FEBS Lett 93: 205-214
Edman P, Begg G (1967) Eur J Biochem 1: 80-91
Edman P, Henschen A (1975) In: Needleman SB (ed) Protein sequence determination. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 232-279
Lehmann A, Wittmann-Liebold B (1984) FEBS Lett 176: 360-364
Tsiboli P, Konstantinidis G, Katsani K, Skendros Y, Choli T (1996) (manuscript in preparation)
Wittmann-Liebold B, Kimura M (1984) In: Walker JM (ed) Methods in molecular biology, vol 1. Humana, Clifton, NJ, pp 221-242

第 11 章

肽和蛋白质的固相测序

J. Salnikow

11.1 背　景

Edman 降解代表多肽和蛋白质化学法测序的经典反应。在液相测序中，反应是均一的，它利用在两种互不相溶相（水/有机溶剂）中分配系数的不同来分离过剩的试剂和产物。这个原理在由 Edman 本人设计的第一个旋转杯测序仪中得到了完善。在现代的气相测序中，除了要把样品通过非共价键固定在一种固相基质上（如 Immobilon，Millipore，Eschborn，德国）和试剂要在液相或气相条件下使用以外，其他物理条件是相似的。整个系统的小型化与微小体积剂量装置的结合使这类仪器具有很高的灵敏度。

疏水性多肽与试剂的分配系数的差别不太明显。然而，经常会观察到洗涤时样品的逐渐损失。这个缺点促使 Laursen 在 1971 年提出了将蛋白质或多肽共价连接到一个固相基质上进行测序的方法——这就是固相测序的原理。样品的共价结合允许通过简单的清洗去除任何过剩的试剂和其他许多种溶剂中所含有的化学物质，同时也避免了冲洗时的样品丢失。因此固相测序为 Edman 化学法提供了最大的灵活性。其主要优点如下：

- 样品不会被冲洗掉。
- 可使用极性溶剂，如去除从磷酸化氨基酸衍生得到的极性很强的苯乙内酰硫脲（PTH）。
- 可允许使用带有易于检测生色团/荧光团的新型 Edman 试剂。

特别地，固相测序尤其可对那些在双偶联过程中与异硫氰酸苯酯相结合的新型的有发展前景的 Edman 试剂进行评价测定(Salnikow et al.1981,1987;Salnikow 1986,1992)。

与固相测序相关的问题在于化学结合过程的结果，只有极少数几种化学方法有实用价值。最理想的结合即 C 端唯一连接，并不是一个通用的方法，只可能用于一些特殊情况。一般的方法是多点固定，也就是假如最后一个氨基酸未固定，最后一个连接点后的肽链部分就会从基质上脱落而无法测序。而且结合率各自不同。作为实际定量结合的结果，对于以 PTH 衍生物形式紧密结合在基质上的氨基酸，只有极少数被释放或根本不释放。而对固定不完全的氨基酸在测序过程中极易鉴定。必须通过实验而不是随意地在结合率和固定化氨基酸的鉴定之间寻找一种折衷的办法；在大多数情况下，要以牺牲包括与基质连接的氨基酸在内的所有氨基酸残基的明确鉴定为代价，来获得小肽或蛋白质的较高结合率。

11.2 原　　理

近来，使用含氨基的基质，共有三种不同的结合方法用于固相测序。

11.2.1 用 DITC 固定（对苯二异硫氰酸）

DITC 是一种双功能的 Edman 试剂。第一步，带有氨基的基质被活化形成一种聚合的氨基酸衍生物；在第二步偶联反应中，该衍生物使蛋白质或肽样品通过 N 端和另外的赖氨酸侧链固定（图 11.1）。在固定化样品的 Edman 降解过程中，N 端残基在裂解过程中被释放，从而暴露出下一个氨基酸以进行第二轮循环（图 11.2）。蛋白质是多点结合的，多肽链会通过内部的赖氨酸侧链结合到基质上。如果结合率不能定量，N 端氨基酸和内部赖氨酸残基有时可被鉴定。带有 C 端赖氨酸的胰蛋白酶切肽段可一直测序到倒数第二个氨基酸残基。其他含有内部赖氨酸的肽在最后一个共价连接点后将会从基质上被释放。不含有赖氨酸的肽仅通过 N 端结合而不能测序。

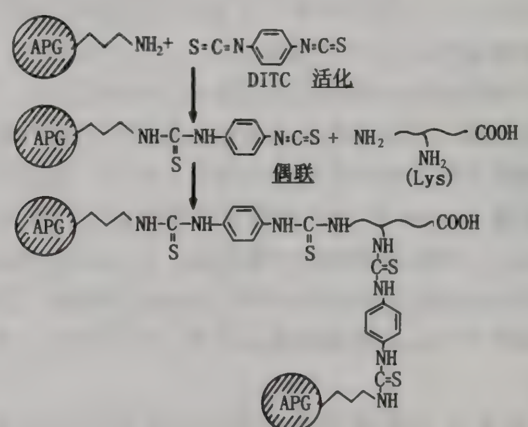


图 11.1　DITC 结合蛋白质/肽于带有氨基基团的基质（APG：氨基丙基玻璃）。

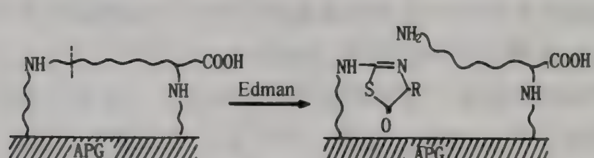


图 11.2　在第一轮 Edman 降解循环中 N 端氨基酸的裂解。

11.2.2 用 EDC（N-乙基-N′-3-二甲基氨丙基碳化二亚胺）固定

如果样品含有另外的羧基侧链，可通过羧基偶联产生多点连接从而替代用 DITC 结合。而羧基结合总意味着理想的 C 端固定，可测序至最后一个氨基酸（图 11.3）。所使

用基质的性质对有效的羧基结合非常重要：鉴于脂肪族氨基基团会导致很低的固定产率，氨苯基树脂由于其在 pH5.0 有较高的芳香胺亲核性而成为较好的选择对象（Liang and Laursen 1990）。

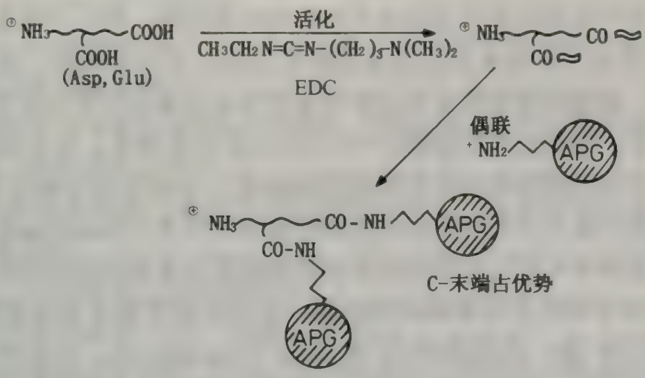


图 11.3　用 EDC 固定（APG，氨基丙基玻璃）。

11.2.3　内脂固定

当蛋白质或肽的羧基被选择性活化时，通过 C 端氨基酸唯一结合是可能的。在溴化氰裂解含有甲硫氨酸的多肽时会观察到内酯的形成就是一个例子（图 11.4）。用二甲

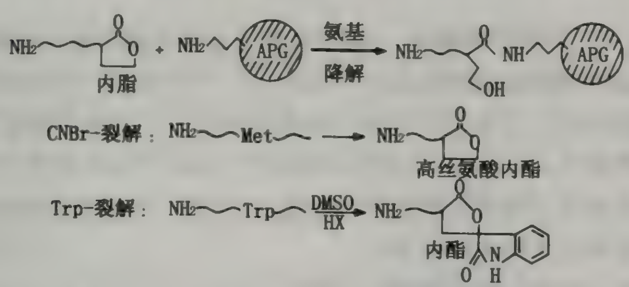


图 11.4　内酯固定（APG，氨基丙基玻璃）。

亚砜/卤酸或亚碘酰基苯甲酸处理来裂解色氨酰键的时候会形成一种类似的反应衍生物（Mahoney and Hermodson 1979；Mahoney et al. 1981）。

这些反应对固相测序非常有用：在 C 端产生最佳的单点结合，同时使测序至最后一个氨基酸成为可能。然而这种类型的结合仅限于含甲硫氨酸和(或)色氨酸的多肽。

这些不同的结合方法最初是为一种固相技术而发展起来的，此技术使用装有合适玻璃珠衍生物的反应柱。虽然手工降解方法已有报道（Chang 1979；Rodrigues et al. 1994），大多数固相测序技术都是自动进行的。高灵敏度气相测序仪的出现引发了利用玻璃滤膜或聚偏二氟乙烯（PVDF）膜的自动固相结合化学的复兴。另外，此项技术还有一个优点，即通过现代印迹技术将高效凝胶电泳与测序直接相连，从而免去了费力而且损失样品的洗脱过程。

11.3 方　　法

用于固相测序的基质包括功能基化的聚苯乙烯、玻璃或 PVDF（Immobilon）。由于聚苯乙烯在有机溶剂中溶胀而在自动柱技术中引发许多问题，现已不再受欢迎。另外，它的高度疏水性也限制了拥有疏水功能基的新型 Edman 试剂的使用，因为这会导致与基质强烈相互作用。氨基丙基和氨基苯基玻璃基质很容易通过玻璃与各自的三乙氧基甲硅烷衍生物反应制备。在反应柱固相技术中，CPG（多孔玻璃珠）由于其伸展的内表面而为多肽提供了一个有足够容量和极好流动性的基质。可通过希夫碱与 2-羟基萘甲醛反应并分光光度检测从基质上释放的芳香醛来测定偶联容量（Schmitt and Walker 1977）。

在使用膜或玻璃滤片的气相测序仪中也能获得带有氨基基团的衍生物。可以用近似于制备 CPG 的方法来制备芳香氨基玻璃滤膜。已可买到带有芳香氨基侧链或带有 DITC 修饰衍生物的 PVDF 膜，其商品名为 Sequelon（Sequelon-AA，芳香胺，Sequelon-DITC，DITC 修饰 PVDF；MilliGen/Biosearch，Millipore 分部）。它们的昂贵价格促使了简单的化学方法的发展，它从相对便宜的 PVDF 膜开始，最终产生了大量的各自氨基衍生物（Rodrigues et al. 1994）。

11.3.1　玻璃和膜基质

氨基丙基（或氨基苯基）玻璃的制备

1）将 4g CPG 珠放入一个圆形烧瓶中，180℃条件下在真空室干燥 2 小时。
2）加入 30ml 用硫酸钙饱和的甲苯。
3）加入 3ml 3-氨基丙基三丁氧基甲硅烷（或氨基苯基三丁氧基甲硅烷）。
4）用一个水泵短暂脱气。
5）加入一个磁力搅拌子，将混合物在 75℃保温 20 小时，用最低速度不时地搅拌。
6）通过一个玻璃纤维过滤除去 CPG 珠。
7）用甲苯和丙酮彻底冲洗 CPG 衍生物。
8）将 CPG 衍生物放入真空干燥器中干燥。

注意：一般来说，孔径为 75Å 的 CPG 对大多数肽和蛋白质都足够了。对一些特别大的多肽建议使用较大孔径的 CPG；然而，这样就会使得它们的内表面减小，结合能力也相应减小。

氨基的测定

本方案基于 Schmitt 和 Walker（1977）。

1）在一小试管中混合 10ml 氨基丙基玻璃和 2ml 0.2mol/L 的 2-羟基-1-萘乙醛（溶解于刚蒸馏的二甲基甲酰胺中），慢慢地搅拌，在室温下保温 15 小时。
2）用 3ml 二甲基甲酰胺冲洗 4 次，接着用 3ml 的乙醇继续洗涤数次，直到在 270nm 的吸光度达到零为止（以纯乙醇为参照）。
3）加入 2ml 0.4mol/L 苄基胺，在室温下保温 45 分钟，并慢慢搅拌。
4）离心，测上清液在 420nm 的吸光度。

注意：在上清液中的苄基氨基希夫碱的 A_{420} 为 10900。制备较好的氨基丙基玻璃的偶联容量为每克玻璃 0.20 ~ 0.22mmol 氨基基团。

芳香胺基玻璃滤膜的制备

本方案基于 Aebersold 等（1990）。

1）将环形的 Whatman GF/F 滤膜在盛有无水三氟乙酸的烧杯中室温下放置 1 小时，且不时摇动（使用有效的通风橱）。

注意：无水三氟乙酸是一种强腐蚀性和剧毒的化学物质，使用时应戴手套并注意保护眼睛！

2）取出玻璃滤膜，放在滤纸上晾干。

3）将预先活化的玻璃滤膜放入装有含 2% 氨基苯基三丁氧基甲硅烷的丙酮/水（1∶1，v/v）溶液的塑料袋中。

4）37℃保温过夜，且在摇床上轻轻摇动。

5）用丙酮洗涤衍生玻璃滤膜 10 次（每次 5 分钟）。

6）将洗过的玻璃滤膜放在烘箱中 110℃干燥 45 分钟，然后放入密封的陪替氏培养皿中室温保存。

注意：用三氟乙酸浸蚀玻璃滤膜可提高对硅烷衍生物的反应活性。通过在同一条件下用 3-氨基丙基三丁氧基甲硅烷制备相应的氨基丙基衍生物和利用 2-羟基-1-萘乙醛试验测定氨基基团（见上文）可大概估计芳香胺的含量。或者，过量的肽可结合到膜上，并通过水解和氨基酸分析或在使用放射性样品时利用闪烁计数来测定偶联容量。

氨基基团功能化的 PVDF 膜的制备

本方案基于 Rodrigues 等（1994）。

1）用 0.5mol/L KOH 温育 PVDF 膜片（Immobilon-P 或 Immobilon-P^{SQ}）1.5 分钟，且轻轻搅拌。

2）用镊子将膜片转移到 2ml 0.2mol/L 的碳酸氢钠溶液（pH9.0）中 1 分钟。

3）将膜片转至 2ml 含有 2% 三乙胺（v/v）和 0.1% 聚烯丙胺盐酸化物（w/v）的 50% 甲醇溶液中放置 2 分钟。

4）把膜片放入用射流水泵抽真空的真空干燥器中除去溶剂。

5）用甲醇润湿干燥的膜片，并对每一个膜片再次使用 15μl 三乙胺/聚烯丙胺试剂（见上述）处理，然后再次干燥。

6）将半干的膜片放入盛有 1ml 0.2mol/L 碳酸钠溶液（pH10.5）的管形瓶中保温过夜。

7）用去离子水洗涤膜片，接着用甲醇然后用水（每次 3ml，1 ~ 2 分钟）清洗膜片。在 -20℃甲醇中保存膜片。

注意：氨基基团功能化的 PVDF 膜的偶联能力比商品化的膜低；然而，它们可用于 DITC 偶联和自动及手工测序。可通过肽样品的结合和酸水解后的氨基酸分析来测定偶联容量（Rodrigues et al.）。

DITC 玻璃珠（DITC 修饰的氨基丙基 CPG）的制备

1）将 100mg DITC 溶解于 2ml 新蒸馏的二甲基甲酰胺中，加入 160mg 氨基丙基玻璃（CPG，75Å）。

注意：二甲基甲酰胺可用苯代替。尽管认为 DITC 玻璃珠可在 -20℃保存，但新鲜配制的衍生物显示最好的偶

联效果。

2）加入 20μl 三乙胺在 25℃轻轻搅拌保温 1 小时。上清液将变为浅黄色。

3）用 2ml 二甲基甲酰胺（DMF）洗涤 DITC 玻璃珠 2 次，接着用 5ml 的甲醇和丙酮洗涤 4 次。

4）用真空干燥器干燥。

注意：对放在干燥器中的 CPG 珠的突然抽气和通气会引起珠子的跳动而丢失基质。可通过把玻璃珠放入 Parafilm 密封的管形瓶中并用一根好的缝衣针几次刺穿 Parafilm 的方法来缓解这个问题。或者，可使用带玻璃纤维塞子的管形瓶。

11.3.2 DITC 偶联分析

使用 DITC 玻璃珠

这个实验是为装有 DITC 玻璃的毛细管柱的自动固相测序而设计的（Liang and Laursen1990），但它也可以用于其他固相技术。

1）将 20～1000pmol 的多肽溶于 30ml 的偶联缓冲液中：0.2mol/L 磷酸氢二钠（pH9.0），1%SDS（十二烷基磺酸钠）。

2）加入大约 30μl 的 DITC 玻璃珠。

3）55℃保温 45 分钟。

4）用蒸馏水然后用甲醇清洗 2～3 次，用氮气吹干。

使用 DITC 修饰的 PVDF

本方案基于 Herfurth 等（1990）。

注意：DITC 偶联常导致很高的结合产率。而用 DITC 修饰的氨基丙基玻璃，有时能在低结合产率下检测到 N 端氨基酸包括内部赖氨酸；用 DITC-PVDF 膜固定一般是定量的。对适当浓度 SDS 的耐受性，使得这个结合技术成为一些像膜蛋白这样的不溶性多肽的可供选择的方法。

1）将 100～500pmol 的含有赖氨酸的多肽溶于 20～40μl 的偶联缓冲液中：含有 50%乙醇的 0.2mol/L N－乙基吗啉（pH8.0）或含有 50%乙醇和 0.25%SDS 的 0.1mol/L 碳酸氢钠溶液（pH11.4）。

2）将 5μl 等份多肽溶液加入到置于测序仪反应筒上已活化的膜上。

3）用氮气流吹干。

4）用另外的 5μl 样品重复上述操作，直到所有样品用完为止（总时间大约 45 分钟）。

注意：避免使用含有胺或铵离子的缓冲液或试剂。因为它们通过竞争性反应减少 DITC 基质的结合容量。DITC-PVDF 膜的结合缓冲液必须含有至少 20%的一种水溶性的有机试剂，因为 DITC-PVDF 膜不能用水湿润（Herfurth et al. 1991）。要测定待测序的多肽在这些缓冲液中溶解度。清洗溶剂如甲醇等应不含醛，以防止 Schiff 碱对 N 端的封闭。不含内部或 C 端赖氨酸的肽不能测序！

11.3.3 EDC 偶联分析

使用氨基苯基玻璃

本方案基于 Liang 和 Laursen（1990）以及 Aebersold 等（1990）。

1）将 20～1000pmol 的多肽溶于 30μl 偶联缓冲液中：0.2～1 mol/L 吡啶－HCl（pH 4.0～5.0），或 0.2～1 mol/L Mes（2－（4－吗啉代）乙磺酸，pH3.5～5.5）。

注意：可耐受 SDS 到 1%。

2）加入 EDC（0.2～2mg 溶解在尽量少的水中）。

3）立即加入 30μl 氨基苯基玻璃。

4）保温 15～60 分钟（25℃或 37℃）。

5）用水、甲醇清洗并用氮气吹干。

使用芳香胺基玻璃滤膜

本方案基于 Aebersold 等（1990）。

1）将肽样品（来自 HPLC，100～500pmol，溶于水或水/乙腈/0.1%三氟乙酸）以小等份加于芳香胺基玻璃滤膜上。

2）用氮气流吹干。

3）加入 30μl 偶联缓冲液：0.2～1 mol/L Mes［2－（4－吗啉代）乙磺酸，pH3.5～5.5］。

4）加入 10μl 新制备的 EDC（每毫升水 20mg）。

5）37℃保温 30～60 分钟。

6）用蒸馏水清洗玻璃纤维滤膜。

7）将膜片插入测序仪。

使用芳香胺基 PVDF 膜

本方案基于 Pappin 等（1989）。

1）将 100～300pmol 溶于 30%～50%丙酮溶液的肽加到膜上。

2）在加热器中 55℃加热直至干燥。

3）1.0mg EDC 溶于 100μl 偶联缓冲液：0.1mol/L Mes［2－（4－吗啉代）乙磺酸，pH5.0］，含 15%乙腈。

注意：避免使用醋酸盐或其他有羧基基团功能的化合物缓冲液，因为它们将竞争性淬灭偶联反应。

4）从加热器中移走膜片，在表面加 5μl 含 EDC 的偶联缓冲液。

5）让反应在室温下进行 20 分钟，然后将膜片转入测序仪的反应筒中。

注意：最佳的羧基结合出现在 pH3～5。在多肽的羧基基团被活化以后，必须立即将它暴露在芳香胺基质中，以保证高的结合产率。虽然多肽的 C 端由于它的较低 pK 值优先被结合，但是内部的谷氨酸和天冬氨酸也能固定住，从而导致测序过程中相应的 PTH 的较少释放。对适当浓度 SDS 的耐受性，使得这项技术适用于一些像膜蛋白这样的不溶性多肽。对缺少赖氨酸的肽来说，EDC 偶联确实可替代 DITC 偶联，它具有另外的优点，即 C 端氨基酸也能被检测。然而，一般来说，EDC 偶联容量比 DITC 要小。

11.3.4 通过 C 端高丝氨酸内酯的肽的偶联

1）将肽干粉溶解于 50μl 无水 TFA 中，在室温下保温 30 分钟。

2）用氮气流去除酸（使用烟雾罩!），将残留物溶于 50μl 新蒸馏的二甲基甲酰胺中。

3）加入 20ml 氨基丙基玻璃。

4）加入 10μl 三乙基胺，轻微地超声处理后在 55℃保温 90 分钟。

5) 用 2ml 甲醇，丙酮清洗玻璃 3 次，在真空干燥器中干燥。

注意：在偶联前用无水 TFA 处理对于肽的大量内酯化和溶解能力是重要的。因此，不提倡在此后用装有 NaOH 的真空干燥器干燥肽，因为它会使肽不溶（Salnikow et al. 1981）。

注意：只有用 BrCN 裂解甲硫氨酰键和用碘代苯甲酸裂解色氨酰键获得的肽才产生 C 末端 γ-羟酸衍生物，它会形成 γ-内酯。所有其他的肽都不可能有此反应过程，因而不能测序。

（朱学勇 译　施蕴渝 校）

参考文献

Aebersold R, Pipes G D, Wettenhall R E H, Nika H, Hood L E (1990) Covalent attachment of peptides for high sensitivity solid-phase sequence analysis. Anal Biochem 187:56–65.

Chang J Y (1979) Manual solid phase sequence analysis of polypeptides using 4-N,N-dimethylaminoazobenzene 4-isothiocyanate. Biochim Biophys Acta 578:188–195

Herfurth E, Pilling U, Wittmann-Liebold B (1991) Microsequencing of proteins and peptides in the Knauer Sequencer with and without covalent attachment to polyvinylidene difluoride membranes by the wet-phase degradation technique. Biol Chem Hoppe-Seyler 372:351–361

Laursen R (1971) Solid phase Edman degradation. An automatic peptide sequencer. Eur J Biochem 20:89–102

Liang S-P, Laursen R (1990) Covalent Immobilization of proteins and peptides for solid-phase sequencing using prepacked capillary columns. Anal Biochem 188:366–373

Mahoney W C, Hermodson M A (1979) High-yield cleavage of tryptophanyl bonds by o-iodosobenzoic acid. Biochemistry 18:3810–3814

Mahoney W C, Smith P K, Hermodson M A (1981) Fragmentation of proteins with o-iodosobenzoic acid: chemical mechanism and identification of o-iodosobenzoic acid as a reactive contaminant that modifies tyrosyl residues. Biochemistry 20:443–448

Pappin D J C, Coull, J M, Köster, H (1989) Covalent sequence analysis of proteins electroblotted or spotted onto PVDF membranes. The Third Symposium of the Protein Society, July 29–August 2, Univ. of Washington, Seattle, WA., MilliGen/Biosearch, Covalent Protein Sequencing Forum

Rodrigues J A, Combrink J, Brandt W F (1994) Derivatization of polyvinylidene difluoride membranes for solid-phase sequence analysis of a phosphorylated sea urchin embryo histone H1 peptide. Anal Biochem 216:365–372

Salnikow J, Lehmann A, Wittmann-Liebold B (1981) Improved automated solid-phase microsequencing of peptides using DABITC. Anal Biochem 117:433–442

Salnikow J (1986) Automated solid-phase microsequencing using DABITC, on column immobilization of proteins. In: Wittmann-Liebold B, Salnikow J, Erdmann V A (eds) Advanced methods in protein microsequence analysis. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp 108–116

Salnikow J, Palacz Z, Wittmann-Liebold B (1987) Automated solid-phase sequencing using fluorescent Edman reagents. In: Walsh K A,(ed) Methods in protein sequence analysis. Humana,Clifton, NJ, pp 247–260

Salnikow J (1992) Proteinchemical methods as tools in modern biotechnology. In: Vardar-Sukan F and Sukan S S (eds) Recent advances in biotechnology. Kluwer Academic, Netherlands, pp 389–395

Schmitt H W, Walker J E (1977) Coupling capacity of solid-phase supports. FEBS Lett 81:403–404

第12章

从聚丙烯酰胺凝胶固定到PVDF膜上的N端封闭蛋白质的序列分析

H. Hirano

12.1 背　　景

1985年，建立了一种新的用于微量测序蛋白质的制备方法（Vandekerckhove et al. 1985）。应用这种方法，亚纳摩尔（subnanomole）量的蛋白质通过单向或双向（2D）聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）得以分离，然后通过电印迹方法从凝胶上转移到用1，5-二甲基-1，5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物（polybrene）处理的玻璃纤维滤膜上，再用气相测序仪直接测序。两年后，发现聚偏二氟乙烯（PVDF）膜可用来取代玻璃纤维滤膜进行有效的电印迹和气相测序（Matsudaira 1987）。PVDF膜与玻璃纤维滤膜相比有许多优势，如在蛋白质结合能力、蛋白质在滤膜上的检测以及处理等方面。从1987年以来，使用PVDF膜电印迹和测序逐渐被广泛地用于蛋白质的序列分析。

但是，即使蛋白质用PAGE得以成功地分离并通过电印迹转移到PVDF膜上，在N末端具有一个封闭基团的蛋白质的N端氨基酸顺序仍不能通过Edman降解法在测序仪中测定。许多蛋白质都是N端封闭的（Aitken 1990，Tsunasawa and Sakiyama 1992）。Brown和Roberts（1976）估计超过50%的可溶性的哺乳动物蛋白质是N末端封闭的。因而，需要一种简便而快捷的技术来获得关于封闭的蛋白质的序列信息。

目前，为此而提出的大多数技术只适合于获得蛋白质内部的顺序。化学的或酶的去封闭的新技术已发展起来，已经能够测定从聚丙烯酰胺凝胶电印迹到PVDF膜上的N端具有乙酰基（acetyl）、甲酰基（formyl）或焦谷氨酰（pyroglutamyl）基团的蛋白质的N端序列（Tsunasawa and Hirano 1993）。

到目前为止，乙酰基修饰被认为是最常见的封闭基团（Tsunsawa and Hirano 1993），甲酰基和焦谷氨酰基团也经常被检测到（表12.1）。在本章，将描述具有这些封闭基团的蛋白质在膜上的去封闭技术及随后的气相测序技术。蛋白质的PAGE和电印迹技术在前面的章节中已经讲述。

应该注意的是，蛋白质在N端被封闭不仅是在体内也能在体外发生。在蛋白质的抽提、PAGE和电印迹过程中防止人为地在体外产生封闭是可能的。使用高纯度的试剂，在抽提、电泳和电印迹缓冲液中加入100pmol巯基乙酸作为自由基清除剂，或者为了从凝胶中去除自由基而进行的预电泳都有助于阻止体外封闭（Moos et al. 1988; Ploug et al. 1992; Walsh et al. 1988）。但是，如果蛋白质在体内被封闭，为了确定N端的顺序

表 12.1 蛋白质中发现的 N 端封闭基团（引自 Tsunasawa and Hirano，1993）

封闭基团	通常影响残基
酰基—	
甲酰基	Gly，Met
乙酰基	Ser，Ala，Met，Gla，Asp，Glu，Thr，Val，Pro
十四酰	Gly
α-酮脂酰	丙酮酰［Ser］，α-酮丁基［Thr］
葡糖苷酸酰	Gly
焦谷氨酰	Glu，Gln
胞壁质	Lys
烷基—	
甲基（单）	Met，Ala，Phe
甲基（双）	Pro
甲基（三）	Ala
葡糖苷	Val：［1-脱氧，1-（N^{α}-Val）-果糖］

则需要一种（如本文所述）化学的或酶的去封闭的操作方法。

12.2 方　法

12.2.1 具有 N 末端乙酰丝氨酸和乙酰苏氨酸蛋白质的去封闭

具有乙酰丝氨酸或乙酰苏氨酸的蛋白质用三氟乙酸（TFA）处理能去封闭（Wellner et al.1990）。大约 36% 和 4% 的乙酰化蛋白质分别以乙酰丝氨酸和乙酰苏氨酸作为 N 端氨基酸。因此，用 TFA 蒸气处理应该能对大约 40% 的乙酰化蛋白质去封闭。但采用这种处理方法，不能使含有其他种类 N 端乙酰氨基酸的蛋白质去封闭。这些蛋白质应该用下述的酰基氨基酸释放酶（AARE）去封闭。

步　骤

1）通过 SDS-PAGE 或 2D-PAGE 分离 N 端被封闭的蛋白质（< 200pmol），把它电印迹到 PVDF 膜上。
2）切下 PVDF 膜上带有蛋白质区带或斑点的部分，放入微量离心管（Eppendorf tube）中。
3）把微量离心管放入一个小瓶（2.6cm × 6cm）中，加入 100 ~ 300μl 的 TFA。
4）用氮气清洗小瓶 30 秒，用瓶塞封口，在 60℃保温 30 分钟。
5）真空干燥膜片后即可用于气相测序。

评　注

Wellner 等(1990) 指出，在去除 N 端乙酰丝氨酸和乙酰苏氨酸的乙酰基团时可能涉及到一种 N→O 酰基转移(图12.1)。这种方法的优点在于去封闭容易且迅速；尽管通过这道程序获得的总体测序产率通常较低(约5%)。如果膜暴露于 TFA 蒸气中超过2小时，PTH-氨基酸的产量增加，但同时那些阻碍 PTH-氨基酸确定的反应副产物也增加了。反应副产物主要是由 TFA 蒸气裂解多肽时产生的(Hulmes and Pan 1991)。

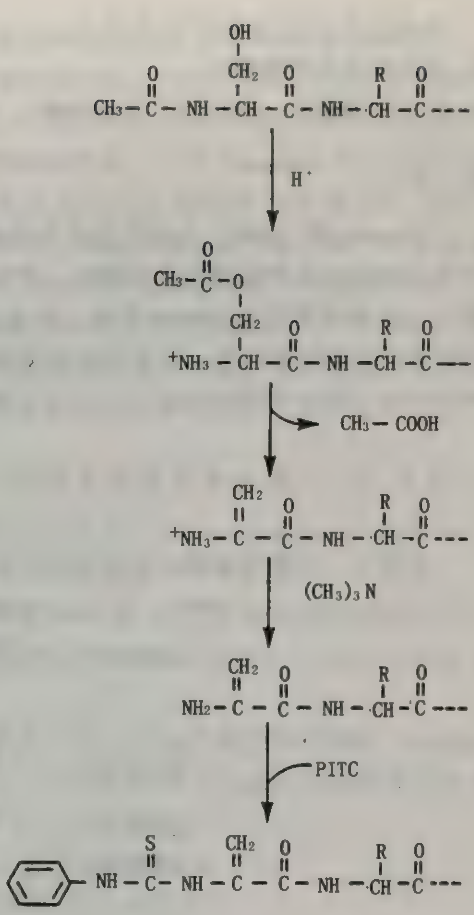


图 12.1　N-乙酰化蛋白质去封闭反应的可能机制（Wellner et al. 1990)。

12.2.2　N 端甲酰化蛋白质的去封闭

当印迹上蛋白质的 PVDF 膜在稀盐酸溶液中保温时，能去除蛋白质的 N-甲酰基团（Ikeuchi and Inoue 1988)。

1) 通过 SDS-PAGE 或2D-PAGE 分离 N-甲酰化蛋白质(< 100pmol)，把它电印迹到 PVDF 膜上。
2) 切下 PVDF 膜上带有蛋白质区带或斑点的部分。
3) 用少量的乙腈湿润膜片，并把它浸泡于200 ~ 500μl，0.6mol/L HCl 中，25℃保温24小时。
4) 用去离子水充分地冲洗 PVDF 膜。
5) 真空干燥膜片，再用于气相测序。

12.2.3　含有 N 末端焦谷氨酸蛋白质的去封闭

蛋白质的 N 端焦谷氨酸能被原位的（*in situ*）焦谷氨酸肽酶消化而去除，随后蛋白质能从第二个残基开始测序（Hirano et al.1991；Moyer et al.1990)。

1) 通过 SDS-PAGE 或 2D-PAGE 分离 N 末端被封闭的蛋白质（ < 100pmol)，电印迹到 PVDF 膜上。
2) 切下 PVDF 膜上带有蛋白质区带或斑点的部分。
3) 用少量的乙腈湿润膜片，并把它浸泡于200μl 含有100mmol/L 乙酸的0.5%(w/v)聚乙烯吡咯烷酮(PVP)-40(Sigma)中，在37℃保温30分钟以封闭膜上未结合蛋白质的位点。
4) 用 5ml 的去离子水冲洗膜片至少 10 次。
5) 把膜浸泡于含有 5mmol/L 二硫苏糖醇（DTT)，10mmol/L EDTA 和 10%（v/v）乙腈的 100μl，0.1mol/L 磷酸缓冲液中（pH8.0)。
6) 加入焦谷氨酸肽酶（Boehringer Mannheim)（5μg，酶/底物 1：1 ~ 1：10)。

7) 在 30℃保温反应溶液 24 小时。
8) 用去离子水清洗膜片。
9) 真空干燥膜片，即可用于气相测序。

评　价

Miyatake 等（1992）在 20℃用无水肼蒸气处理印迹有蛋白质的 PVDF 膜 8 小时，以使含有 N 端焦谷氨酸的蛋白质去封闭。蛋白质的 N 端焦谷氨酸被转变成谷氨酸-γ-酰肼，随后这种物质能进行 Edman 降解。然而这通常能引起天冬酰胺和谷氨酰胺的部分修饰而变为它们的酰肼化物，以及使精氨酸转变为鸟氨酸。在 -5℃，8 小时的更温和的肼解作用对去除 N 甲酰化残基的封闭是有益的。

12.2.4　N-乙酰化蛋白质的去封闭

溶解于一种缓冲溶液中的蛋白质的 N 端乙酰氨基酸可用 AARE（乙酰氨基酸释放酶）去除（Tsunasawa et al.1990）。图 12.2 表示用 AARE 对 N-乙酰蛋白质去封闭的实验过程。

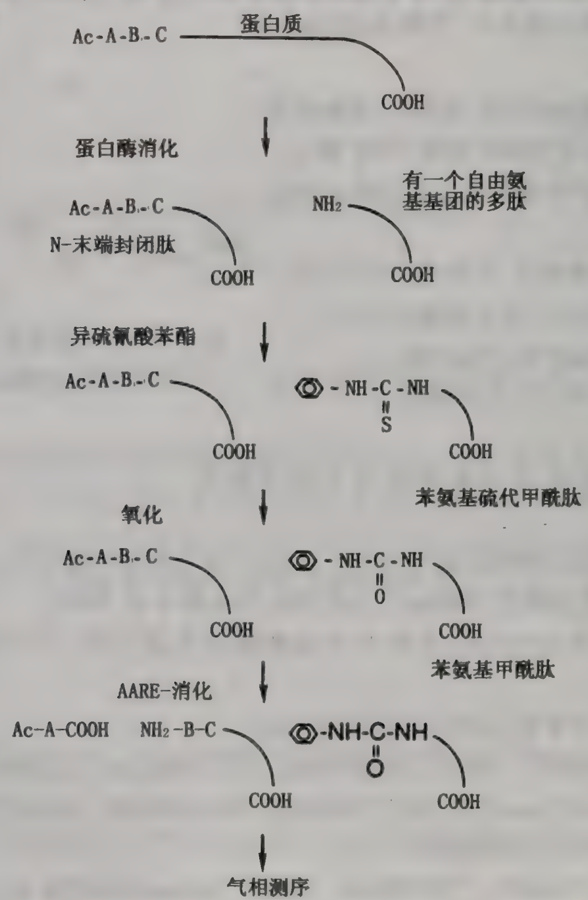


图 12.2　用乙酰氨基酸释放酶（AARE）对乙酰化蛋白质去封闭（Tsunasawa et al.1990）。

这个技术能用于电印迹到 PVDF 膜上的乙酰化蛋白质的去封闭（Hirano et al.1991）。

就焦谷氨酸肽酶而言，具有相对较高分子量的蛋白质，诸如鸡卵核黄素的结合蛋白（34 000）和 *Geotrichum candidum* 脂酶（59 000），可通过酶的直接处理在 PVDF 膜上去封闭。相反地，AARE 不能直接消化具有高分子量的蛋白质。正如 Tsunasawa 等（1990）所描述的那样，AARE 特异地裂解少于 40 个残基的 RCO-X-Y 型肽的 X-Y 键（R：烷基，X/Y：L-氨基酸），因此在用 AARE 消化之前，在膜上的蛋白质应该用蛋白酶，比如胰蛋白酶去消化，随后产生的短肽从膜上释放下来。用这种蛋白酶消化时，消化缓冲液中应含有 10%的乙腈用以减小肽与 PVDF 膜之间的疏水相互作用（Aebersold et al.1987）。通过加入这种有机溶剂，多肽能更有效地从膜上洗脱下来。通过 AARE 消化选择性地去除抽提出的 N 端肽的乙酰化氨基酸。

步　骤

1) 通过 SDS-PAGE 或 2D-PAGE 分离 N 末端被封闭的蛋白质（< 100pmol），电印迹到 PVDF 膜上。
2) 切下 PVDF 膜上带有蛋白质区带或斑点的部分。
3) 用少量的乙腈湿润膜片，用含 100mmol/L 的醋酸的 200μl，0.5%（w/v）PVP-40 于 37℃预处理膜片 30 分钟。
4) 用去离子水彻底冲洗之后，用 5～10μg 胰蛋白酶（甲硫氨酰胰蛋白酶；Promega）（酶/底物：1∶1～1∶10）。在含有 10%（v/v）乙腈的 100μl 0.1mol/L 的碳酸氢铵缓冲液（pH8.0）中 37℃消化膜上的蛋白质 24 小时，同时摇动。
5) 将含有胰蛋白酶分解肽段的消化缓冲液倒入微量离心管中。
6) 用 100μl 去离子水和具有消化缓冲液的洗涤液涡旋洗涤膜片。
7) 真空蒸发消化混合物至干燥，并加入 100μl，50%（v/v）吡啶和 10μl PITC（测序纯）去结合所获得肽的自由氨基。
8) 用氮气冲洗，涡旋反应溶液然后在 3000*g* 下离心 1 分钟。
9) 弃去最终得到的含有反应副产物和过量试剂的上清液，重复这种清洗过程三次，并真空蒸发样品至干燥。
10) 通过混合9ml 甲酸和1ml 30%过氧化氢溶液制备过甲酸溶液，并把这种混合物在室温下放置1小时。加100μl 过甲酸到已干燥的样品中，混合之后，把试管放在冰上(1小时)，使肽的 N 端 PTC(硫代氨基酰苯)基团通过氧化转变成氨甲酰苯(phenylcarbamyl)基团。
11) 真空蒸发样品溶液至干燥，重新悬浮于去离子水中，然后再真空干燥。
12) 重新悬浮样品于含 1mmol/L DTT 的 100μl，0.2mol/L 磷酸缓冲液（pH7.2）中。
13) 溶解 50mU AARE（Takara Shuzo）于 50μl 同样的缓冲液中，并加到混合物中去。在 37℃保温 12 小时以除去 N-乙酰氨基酸。
14) 把样品溶液加入到涂有 polybrene 的玻璃纤维滤膜上并把膜置于气相测序仪反应室上层玻璃块上。

评　价

• 如果通过蛋白酶消化后所获得的 N 端肽多于 10 个残基，它从 PVDF 膜上的抽提就较

困难。在这种情况下，应该在同样的膜上用另一种蛋白酶来进行第二次消化。

- Krishna 等(1991)报道了一种可供选择的方法：经过裂解之后，N 端具有自由氨基的肽被琥珀酰化，然后 N 端被封闭的肽用 AARE 去封闭。
- 如果丁基氯化物(S3)在气相测序仪中 Edman 降解作用发生之前 30 秒被输送，以恢复由 AARE 释放的 N 端被封闭的氨基酸，则封闭基团和 N 端氨基酸可通过质谱法确定。
- 在细胞色素 C（一种 N-乙酰蛋白质）的测序过程中，经过电泳、电印迹、去封闭以及测序等连续步骤，总体初始产率在 23%～25%之间。这里所描述的去封闭和测序的效率主要依赖于胰蛋白酶的消化和随后肽从 PVDF 膜上的洗脱。在胰蛋白酶的消化过程中摇动含有 PVDF 膜的消化溶液能促进胰蛋白酶解肽段的洗脱。
- 如用 N-脂酰基转移酶（Wake Pure Chemicals）取代 AARE，用上述方法可去除被封闭的蛋白质的 N 端十四酰基。

12.3 讨　论

印迹到 PVDF 膜上的蛋白质去封闭的几个优点：

- 通过 PAGE 纯化的蛋白质能有效地被去封闭和测序。
- 化学的或酶的去封闭在没有脱盐的情况下能够顺利进行，因为电印迹到 PVDF 膜上后蛋白质变成几乎完全无盐。
- 蛋白质能在皮摩尔水平去封闭。
- 可进行如下所述的顺序去封闭。

顺序去封闭

上述的去封闭技术可以结合起来使用，顺序去封闭，以测定固定化到 PVDF 膜上的未知蛋白质的序列（图 12.3）。

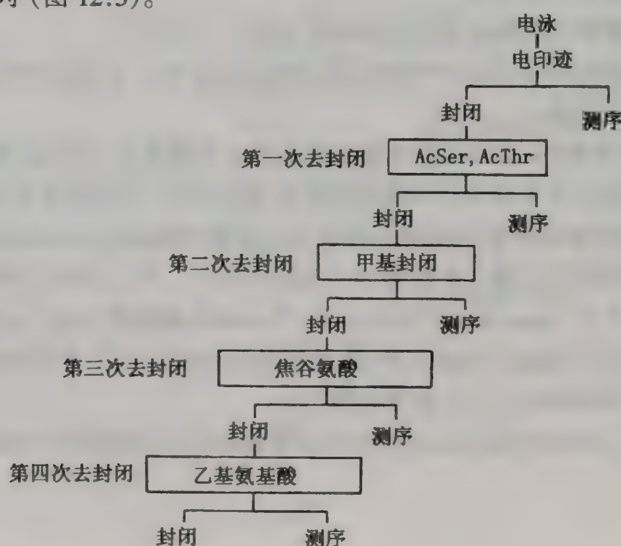


图 12.3　印迹到 PVDF 膜上的 N 末端封闭蛋白质的顺序去封闭技术。

1）蛋白质样品通过电印迹从 PAGE 凝胶转移到 PVDF 膜上。

2）载有蛋白质的膜直接进行气相测序。

3）如果测序（2～3循环）在第二步失败，把膜从测序仪上取下来，用 TFA 蒸气在60℃处理30分钟以除去乙酰丝氨酸或乙酰苏氨酸的乙酰基。如果蛋白质是被乙酰丝氨酸或乙酰苏氨酸 N 端封闭的，可通过这个步骤去除乙酰基，从而使自 N 末端测序成为可能。

4）如果测序在第 3 步失败，则把膜在 0.6mol/L 盐酸 25℃保温 24 小时以除去甲基，然后重新用于序列分析。

5）如果测序在第 4 步失败，则在膜上用焦谷氨酸肽酶消化样品，以去除 N 端焦谷氨酸，然后重新测序。

6）最后，如果测序在第 5 步失败，则执行 AARE 去封闭以去除在第 3 步中未能除去的乙酰氨基酸，然后再次尝试测序。如果测序还是失败，则必须使用其他方法了。

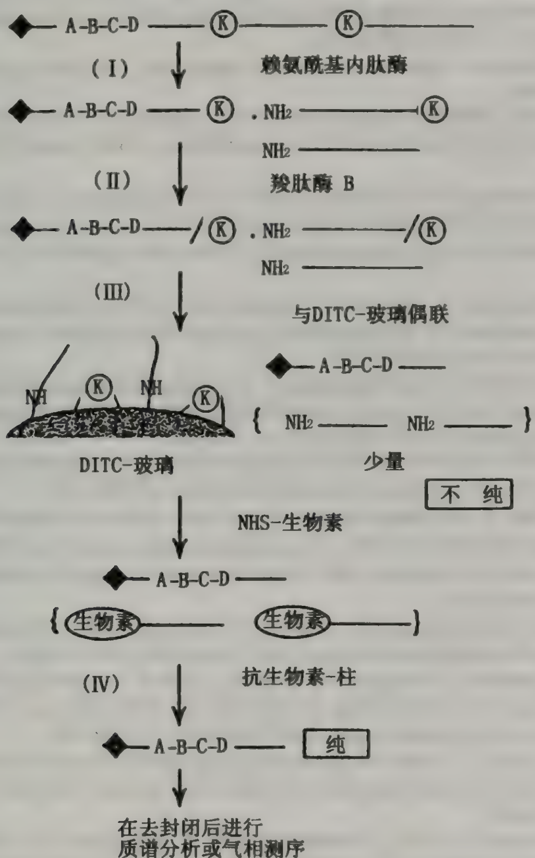


图 12.4　N 端封闭蛋白质中 N 末端肽的分离（Mitsunaga et al. 1993）（1）用赖氨酰基内肽酶消化 N 端封闭蛋白质。（2）用羧肽酶 B 切除肽的 C 端赖氨酸。（3）将肽结合到对苯二异硫氰酸（DITC）玻璃，以去掉除 N 端封闭蛋白质以外的其他肽和赖氨酸残基。（4）用 DITC 玻璃处理后的非吸收组分与 N-羟基琥珀酰亚胺生物素作用，以生物素化（biotinylate）残留肽和赖氨酸的 α 和 ε 氨基基团。将生物素化的肽和赖氨酸残基固定到一根抗生物素蛋白－琼脂糖柱上。N 端封闭肽以一非吸收组分获得。

注意：若某种蛋白质在 Edman 降解中没有获得 N 端序列，则蛋白质的 N 端很可能是封闭的。但是在这个试验阶段不可能知道含有哪种封闭基团。在这种情况下，使用转移到 PVDF 膜上的蛋白质顺序去封闭技术可有效地确认封闭基团并对蛋白质去封闭。

否则，被封闭的 N 端肽被有选择的去除（Mitsunaga et al.1993；Akiyama et al.1994），并且肽的精确质量能通过质谱分析法，如电喷雾离子化法或基质辅助激光解吸飞行时间法，来测定以确定封闭基团。

如果 N 端被封闭蛋白质只能得到皮摩尔量级，则最近由 Mitsunaga 等（1993）发展起来的生物素-抗生物素方法可用来有选择地去除被封闭的 N 端肽（图 12.4）。

（朱学勇 译　施蕴渝 校）

参考文献

Aebersold RH, Leavitt J, Saavedra RA, Hood LE, Kent SBH (1987) Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by one- or two-dimensional gel electrophoresis after in situ protease digestion on nitrocellulose. Proc Natl Acad Sci USA 84: 6970–6974

Aitkin A (1990) Identification of protein consensus sequences, Ellis Horwood, Chichester, West Sussex

Brown J, Roberts W (1976) Evidence that approximately eighty per cent of the soluble proteins from Ehrlich ascites cells are N-acetylated. J Biol Chem 251: 1009–1014

Hirano H, Komatsu S, Nakamura A, Kikuchi F, Kajiwara H, Tsunasawa S, Sakiyama F (1991) Structural homology between semidwarfism-related proteins and glutelin seed protein in rice (*Oryza sativa L.*). Theor Appl Genet 83:153–158

Hirano H, Komatsu S, Takakura H, Sakiyama F, Tsunasawa S (1992) Deblocking and microsequence analysis of N^{α}-acetylated proteins electroblotted onto PVDF membrane. J Biochem 111:754–757

Hirano H, Watanabe T (1990) Microsequencing of proteins electrotransferred onto immobilizing matrices from polyacrylamide gel electrophoresis: Application to an insoluble protein. Electrophoresis 11: 573–580

Hulmes JD, Pan Y-C (1991) Selective cleavage of polypeptides with trifluoroacetic acid: Applications for microsequencing. Anal Biochem 197:368–376

Ikeuchi M, Inoue Y (1988) A new photosystem II reaction center component

Krishna RG, Christopher CQ, Wold F (1991) N-terminal sequence analysis of N-acetylated proteins after unblocking with N-acylaminoacyl peptide hydrolase. Anal Biochem 199:45–50

Matsudaira P (1987) Sequence of picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. J Biol Chem 262:10035–10038

Miyatake N, Kamo M, Satake K, Uchiyama Y, Tsugita A (1992) Removal of N-terminal formyl groups and deblocking of pyrrolidone carboxylic acid of proteins with anhydrous hydrazine vapor. Eur J Biochem 212:785–789

Moos MJr, Nguyen NY, Liu T-Y (1988) Reproducible high yield sequencing of proteins electrophoretically separated and transferred to an inert support. J Biol Chem 263: 6005–6008

Moyer M, Harper A, Payne G, Ryals J, Fowler E (1990) In situ digestion with pyroglutamate aminopeptidase for N-terminal sequencing electroblotted proteins. J Protein Chem 9:282–283

Ploug M, Stoffer B, Jensen AL (1992) In situ alkylation of cysteine residues in a hydrophobic membrane protein immobilized on polyvinylidene difluoride membranes by electroblotting prior to microsequence and amino acid analysis. Electrophoresis 13: 148–153

Tsunasawa S, Hirano H (1993) Deblocking and subsequent microsequence analysis of N-terminally blocked proteins immobilized on PVDF membrane, In: Imahori K, Sakiyama F (eds) Methods in protein sequence analysis. Plenum, New York, pp 43–51

Tsunasawa S, Sakiyama F (1992) Amino-terminal acetylation of proteins. In: Tuboi S, Taniguchi N, Katsumura N (eds) The posttranslational modification of proteins. Japan Scientific Societies, Tokyo, pp 113–121

Tsunasawa S, Takakura H, Sakiyama F (1990) Microsequence analysis of N-acetylated proteins. J Protein Chem 9:265–266

Vandekerckhove J, Bauw G, Puype M, Damme JV, Montagu MV (1985) Protein-blotting on polybrene-coated glass-fiber sheets. A basis for acid hydrolysis and gas-phase sequencing of picomole quantities of protein previously separated on sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel. Eur J Biochem 152:9–19

Walsh MJ, McDougall J, Wittmann-Liebold B (1988) Extended N-terminal sequencing of proteins of archaebacterial ribosomes blotted from two-dimensional gels onto glass fiber and poly(vinylidene difluoride) membrane. Biochemistry 27:6867–6876

Wellner D, Panneerselvam C, Horecker BL (1990) Sequencing of peptides and proteins with blocked N-terminal amino acids: N-acetylserine or N-acetylthreonine. Proc Natl Acad Sci USA 87:1947–1949

第四部分
蛋白质的电泳和印迹

第 13 章

双向电泳

P. Jungblut

13.1 引　　言

在所有生物体的细胞器、细胞和组织中，复杂的功能和代谢反应由每个部件的内部和表面的蛋白质所维持。生物部件中蛋白质的数量与其功能的复杂性密切相关。核糖体，这种相对高特异性的细胞器，在大肠杆菌中有 54 种不同的蛋白质，然而在典型的人类细胞中，可表达的基因大约有 5000 个。人类基因组有 50 000 ~ 100 000 个基因。要定位和鉴定这些复杂系统中的成分必须要有高分辨率的方法。当能够分辨约 50 种不同蛋白质的方法出现后，一种细胞内生物部件——核糖体的所有成分的描述得以实现。这些方法有：双向电泳（2-DE）（Kaltschmidt and Wittmann，1970）和高效液相层析（HPLC）（Kamp and Wittmann-Liebold，1984）。今天，在人类基因组计划中，改进的双向电泳(2-DE)在基因的功能部分即蛋白质的研究方面发挥着重要的作用。蛋白质组成的进一步变化可以用在不同生物情况下（如在疾病期或分化过程中）的减法分析来阐明。

分辨率

自从第一次应用 2-DE 分离蛋白质的方法被阐明以来（Smithies and Poulik 1956），这种技术的分辨率已经从 15 个蛋白质点发展到 10 000 个蛋白质点（Klose and Kobalz 1995）。发展过程中的一个里程碑是 Raymond（1964）将聚丙烯酰胺引入 2-DE 分离。另一个里程碑就是 1973 年，Stegemann 等将等电聚焦（IEF）和十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）相结合。O'Farrell（1975），Klose（1975）和 Scheele（1975）首先结合这些技术在分辨率方面取得了巨大的进步。IEF 和 SDS-PAGE 是高分辨率的电泳方法，在一块胶上可以分离多达 100 种成分。已能结合这些技术初步尝试分辨 1 000 种蛋白质。试图在天然蛋白质的 2-DE 中获得类似于变性条件下 2-DE 的分辨率会导致低重复性、污渍以及不能清晰分辨的蛋白质点。细胞和组织要获得高分辨率的前提是加入还原试剂如 70mmol/L 二硫苏糖醇来还原所有的二硫键，或者加入 9mol/L 尿素和 3% SDS 使蛋白质复合物完全变为多肽链。

改善分辨率的主要因素有：增加的灵敏度、应用复杂的两性电解质、减小凝胶厚度（1.5 ~ 0.5mm）以及增大凝胶面积（30cm × 40cm）。与色谱法相似，这些凝胶被称为高效双向电泳（HP-2-DE）凝胶。

重复性

鉴于 2-DE 可以获得其他蛋白质分析方法所不能得到的分辨率，重复性就成为 2-DE 的特殊问题。其原因有：①技术水平的发展比不上 HPLC，②分离问题的复杂性高于 HPLC，③凝胶基质是在各个方向有柔性的，④如果在 IEF 凝胶系统中有杂质会产生阴极漂流效应，⑤凝胶的处理需要经验。

蛋白质点银染强度的重复性的变化系数在 15% 的范围内，单点的最大值为 35%。这些数据是采用大块凝胶 2-DE 技术在第一向使用载体两性电解质，比较一个蛋白质样品八块凝胶获得的。这些凝胶是由一个有 1 个月 2-DE 经验的学生制备的。为了提高 2-DE凝胶的重复性，引入了固定的载体两性电解质（Immobiline）（Görg et al. 1988），可是由 Immobiline-2-DE 凝胶（Pharmacia，Freiburg，德国）无法获得同等的重复性数据。

通过简化程序可以提高重复性，例如省去浓缩胶、在第二向电泳中使用连续的分离胶、以及在 IEF 和 SDS-PAGE（WITA，Teltow，德国）中使用预先准备好的凝胶溶液，或者对 Immobiline 凝胶（Görg et al. 1988）使用预先制备好的凝胶。整个 2-DE 过程的自动化已经作了初步尝试（Nokihara et al. 1992；Harrington et al. 1993）。

在最适的条件下，蛋白质点位置的重复性并不是一个严重的问题。对八块凝胶来说，两个蛋白质点之间距离的变化系数在 2% 范围，最大值为 3.4%。不同凝胶中的蛋白质斑点的肉眼或计算机辅助的指认在大多数情况下都是明确的。即使实验室之间的比较也是成功的，正如我们通过比较在柏林、慕尼黑和伦敦得到的人类心脏 2-DE 图谱中已鉴定斑点所证明的那样（Baker et al. 1992）。

灵敏度

在凝胶上的蛋白质可通过铜负染、考马斯亮蓝 R 染色、考马斯亮蓝 G 染色、银染、或通过具有高的灵敏度的放射化学方法检测。考马斯亮蓝 R 的检测限在 0.1μg 范围。银染的检测限在 1～10ng 范围。放射性标记的检测灵敏度依赖于蛋白质可获得的特异性放射活性。在荧光标记的凝胶上，出现频率为每个细胞 7 个分子的胞内蛋白质都可观察到（Jungblut et al. 1987）。

蛋白质可在印迹到聚偏二氟乙烯膜上或经修饰的玻璃纤维膜上之后，通过 Poinceau S、氨基黑、考马斯亮蓝 R 或 sulforhodamine 染色，或使用更高敏感性的免疫染色来观察。

减法分析

与经典的生物化学方法（如同大海捞针）不同，采用如图 13.1 所示的综合的方法，减法分析（Aebersold et al. 1990）可以阐明生物学变化相关的蛋白质，如与疾病相关的蛋白质。通过测序、氨基酸分析、或使用质谱法可以分析蛋白质，通过蛋白质数据库搜索可以鉴定蛋白质（Vansekerckhove et al. 1985；Aebersold 1986；Pappin et al. 1993；Zeindl et al. 1994；Knecht et al. 1994）。一种肿瘤相关蛋白质被确证为醛糖还原酶（Zeindl-Eberhart et al. 1994），315 个氨基酸中，112 个已经被测序。依据这些数据，不仅蛋白质的名称可以确定，而且蛋白质的右旋异构体即胚胎期的醛糖还原酶也可被认定为

变异蛋白质。在扩张性心肌病中，通过比较心肌层 2-DE 的斑点强度变化，有 4 种蛋白质被认为是与疾病相关的：肌酸激酶、苹果酸脱氢酶、α-晶状体蛋白质 B 和热休克蛋白质 27（Knecht et al. 1994；Otto et al. 1994）。

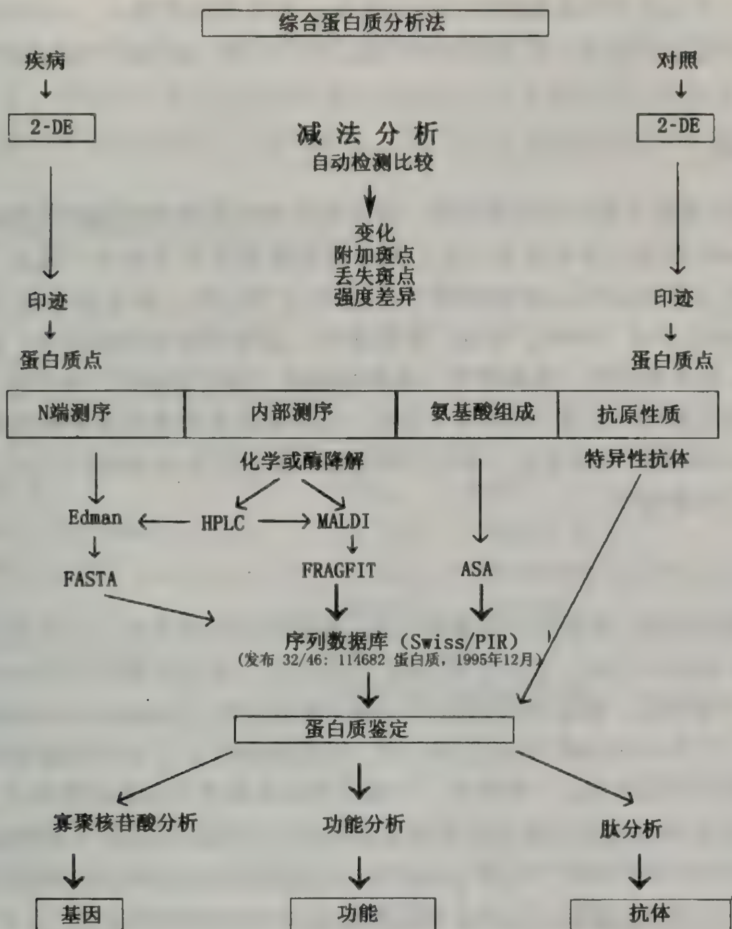


图 13.1 综合蛋白质分析法。PIR，蛋白质信息源；FASTA 序列数据库序列搜索程序；FRAGFIT，序列数据库中质谱质量数据搜索程序；ASA，序列数据库氨基酸组成数据搜索程序。

2-DE 凝胶的检测

可以用目测或通过计算计辅助自动化检测 2-DE 凝胶。目测是非常精确的，蛋白质斑点强度有 10% 的变化就可以可靠地检测出来（Jungblut et al. 1986）。另外，在不同凝胶上寻找对应斑点时，目测比自动匹配要容易得多。目测也不要昂贵的软件和硬件，但是，随着需要检测的蛋白质斑点的增多、凝胶的增大，目测工作也越来越繁重。要在 20 块 30cm×40cm 的凝胶中比较一个蛋白质斑点的强度几乎是不可能的。但是通过自动化检测，可以在监视器上把感兴趣的斑点放在 20 个窗口中比较，同时也可控制计算强度差值。对自动化检测来说，最好的凝胶质量、最佳的斑点检测参数以及交互式人机对话是必要的。过程可分为 5 个步骤：①扫描数据的数字化；②背景和污点的校正；③斑

点的检测；④定量表示；⑤不同凝胶的匹配比较。可以购得不同的自动化检测系统。需要指出的是，如果没有引入赝象，从目测变为自动检测不能提高灵敏度（Prehm et al. 1987）。

评价一个自动化检测系统的效率的标准有：局部的分辨能力、光密度的动态范围、每个软件程序的工作时间、斑点测试和匹配过程的质量、交互式人机对话的可能性、价格。

2-DE 的数据库

来自 2-DE 凝胶上蛋白质减法分析、鉴定和特性的大量数据储存在 2-DE 数据库中，在 Electrophoresis 杂志上每年发表一次，其中部分数据可在互联网上通过 WWW 技术获得。例如人类心脏蛋白质 2-DE 数据库中有 3239 个蛋白质，到目前为止，已经有 66 个被注解（Jungblut et al. 1994）。在这个数据库中，注释所使用的标准有：扩张性心肌病相关蛋白质、N 末端序列、内部序列、氨基酸组成、蛋白质名称、分子量、等电点、以及与鉴定有关的参照。尽管 Baker 等（1992）的心肌层蛋白质的数据使用的是另一种方法、另一个 2-DE 凝胶系统和另一种大小的凝胶，但是仍有 40 种蛋白质可从这个数据库直接转到我们的数据库。

凝胶大小

正如上面提到的，凝胶大小是影响 2-DE 凝胶的分辨能力的一个很重要的因素。使用小凝胶（6.5cm × 7.5cm）可以分辨 1000 个蛋白质，使用大凝胶（30cm × 40cm）可以分辨 10 000 个蛋白质。在这里我们描述一种小凝胶技术（Jungblut and Seifert 1990），它很容易建立，并且足够分辨 1000 个蛋白质。在细胞器水平上进行减法分析，可以得到蛋白质组成变化的很多信息。很明显，与通过单向电泳进行血清检测相比，使用简单的 2-DE 技术可以从微生物的印迹上得到更多的信息，而且还可用于纯化后蛋白质的纯度检测。使用预制的凝胶溶液可以减少在凝胶上分辨率不高时的耗费时间的错误检查。这套方法同样可应用于大凝胶，但是花费随凝胶的大小成对数增长。

13.2 流程图

— 第一天：
  样品制备
  准备 IEF 的凝胶条
— 第二天：
  加样
  IEF 电泳
  SDS-PAGE 凝胶的制备
  IEF 凝胶的平衡
  加样
  SDS-PAGE 电泳

固定（过夜）

— 第三天：

染色

样品也可以在 – 70℃或液氮中制备和保存。以上的程序适合于银染，对考马斯亮蓝R-250染色固定时间可减少到1小时，染色过夜后，第三天脱色。如果SDS-PAGE凝胶是用来做印迹，则程序可在IEF凝胶平衡之后中断。平衡后的IEF凝胶可在 – 70℃保存几个月。第三天做SDS-PAGE、印迹和染色，SDS-PAGE后和印迹前不宜中断。

13.3 2-DE的凝胶制备

13.3.1 固相探针

裂解缓冲液

9mol/L 尿素	108mg	尿素
70mmol/L 二硫苏糖醇（DTT）	加 10μl	1.4mol/L 的 DTT
2%的两性电解质（Servalyte2 – 4）	加 10μl	40%的两性电解质（Servalyte2 – 4）
	加 100μl	去离子水
		配制 200μl裂解缓冲液

步　骤

裂解缓冲液以一定的体积/质量比加到探针中。对单一蛋白质，其浓度应为0.5～1.0mg/ml；对蛋白质混合液，其浓度应为10～30mg/ml。

样品于室温下在裂解缓冲液中保存30分钟，并不时用加裂解缓冲液的移液管头轻轻搅动，溶解之后，样品冰冻保存于 – 70℃。

13.3.2 液相探针

首先确定探针的体积（Y）的微升数，这个体积的数字用Y因子来表示。通过此因子，需加入的尿素、DTT、两性电解质可以计算如下：

Y × 1.08 = 尿素的毫克数

Y × 0.1 = 1.4mol/L DTT的微升数

Y × 0.1 = 40%两性电解质（Servalyte2 – 4）的微升数

例如：对100μl探针，需加入108mg尿素、10μl 1.4mol/L DTT、10μl 40%两性电解质（Servalyte 2 – 4）。

通过这种调整，最初的探针溶液体积变为原来的2倍，蛋白质浓度变为原来的一半。

13.3.3 组织匀浆

AP 缓冲液

AP 缓冲液（从德文 Aufarbeitungspuffer 衍生而来）含有下列组分：9mol/L 尿素、2 % 两性电解质、pH2～4（Servalyte）、70mmol/L DTT、25mmol/L Tris/HCl（pH7.1）、50mmol/L KCl、3mmol/L EDTA、2.9mmol/L 苯甲脒、2.1μmol/L 亮肽素。为了保护蛋白质不被蛋白酶降解，在样品中加入 0.02 倍体积的 5μmol/L 的胃酶抑素、50mmol/L PMSF 的乙醇溶液（在事先加入 AP 缓冲液后）。AP 缓冲液和胃酶抑素/PMSF 溶液可通过 WITA（Teltow，德国）得到。

组织切片 < 20mg

小于 20mg 的组织切片冰冻保存于 Eppendorf 管，这些管子置于液氮中冷却，同时用适合于 Eppendorf 管的尖的玻璃研棒（WITA，Teltow，德国）匀浆。在融化时，以一定的体积/质量比加入 AP 缓冲液或裂解缓冲液。建议采用缓冲液体积/组织质量比大于 6∶1 以保证样品中 9mol/L 尿素的浓度。

组织切片 > 20mg

大于 20mg 的组织样品被放于玛瑙或石英研钵（WITA，Teltow，德国），研钵置于液氮骤冷，用一个预冷的研棒（WITA，Teltow，德国）将样品匀浆。融化之后，以一定体积/质量比（大于 6∶1）加入裂解缓冲液或 AP 缓冲液。建议用 AP 缓冲液代替裂解缓冲液以保持离子强度，并防止样品的蛋白水解。

13.4 2-DE 的溶液

第一向：IEF

1）制备 0.8% APS：称取 0.8g 过硫酸铵（APS），用去离子水定容至 100ml，分装为每 60μl 等份，－70℃保存。
2）IEF 分离胶：4%（w/v）丙烯酰胺、0.3%（w/v）哌嗪双丙烯酰胺、2% WITAlyte（pH2～11）、9.0mol/L 尿素、5%（w/v）甘油、0.06%（v/v）TEMED、0.02%（w/v）APS。临使用之前，加入 35μl 0.8% APS 与 1365μl 已除气的分离胶溶液（WITA，Teltow，德国）混合。
3）IEF-帽（IEF-cap）凝胶：10%（w/v）丙烯酰胺、0.13%（w/v）哌嗪双丙烯酰胺、2% WITA（pH2～11）、9.0mol/L 尿素、5%（w/v）甘油、0.06%（v/v）TEMED、0.02%（w/v）APS。临用前，将 10μl 0.8%的 APS 与 390μl 已除气的帽凝胶溶液相混合。
4）制备阳极溶液：7.27%（w/v）磷酸、3.0mol/L 尿素。

注意：下列成分应新鲜配制。称取 45g 尿素放于一个小烧杯，用量筒加入 237.5ml 去离子水，将水倒入烧杯磁力搅拌直至溶解。烧杯上封上 Parafilm 膜，临用前加入 12.5ml 85%（w/v）磷酸并磁力搅拌。

5）阴极溶液：5% 乙烯二胺、9.0mol/L 尿素、5%（v/v）甘油。

注意：下列成分应新鲜配制。称取 135g 尿素和 12.5g 甘油，加入去离子水至 237.5ml。在烧杯中磁力搅拌，加热到 40℃，直至尿素和甘油溶解。临用前迅速加入乙二胺，磁力搅拌。

6）制备覆盖溶液：5%（w/v）甘油、5mol/L 尿素、2%（w/v）Servalyte 2－4。称取 6g 尿素和 1g 甘油，加入去离子水至 12ml。从此储备液中取出 3.8ml，与 0.2ml 的 Servalyte 2－4 混合，分装为 200μl 等份。

7）制备含 70mmol/L DTT 的 Sephadex 凝胶溶液（WITA，Teltow，德国）。使用之前将 100mg Sephadex 凝胶溶液与 108mg 尿素和 10.0μl Servalyte 2－4 混合，在涡旋器上充分振荡 10～15 分钟。

8）制备平衡溶液：125mmol/L Tris/磷酸盐（pH6.8）、40%（m/v）甘油、65mmol/L DTT、3%（m/v）SDS。

8a）制备缓冲液：称取 12.11g Tris 碱，加入去离子水至 35ml。用 1mol/L 磷酸调 pH 为 6.8，并加入去离子水至 100ml。

8b）制备溶液：将 160g 甘油和 12gSDS 加入 50ml 缓冲液中，用去离子水定容到 400ml，20ml 等份分装并保存于－70℃。临用前将每一等份加入 0.2g DTT 溶解。

第二向 SDS-PAGE

9）制备1.28%(m/v) APS：称取 1.28g 过硫酸铵，用去离子水定容到 100ml，1.2ml 分装。

10）制备琼脂糖：1%（w/v）琼脂糖（低溶点，制备级，BioRad，Munich，德国）、125mmol/L Tris/磷酸盐（pH6.8）、0.1%（w/v）SDS。量取 1.25ml 平衡缓冲液（见步骤 8）。加 8.7ml 的 0.115%（m/v）SDS 溶液和 0.1g 琼脂糖。70℃溶解。如果马上使用，保存于 40℃；如果过一段时间使用，保存于 4℃。

11）制备 SDS-PAGE 凝胶：15%（w/v）丙烯酰胺，0.2%（w/v）双丙烯酰胺，375mmol/L Tris-HCl（pH8.8，20℃），0.03%（v/v）TEMED，0.1%（w/v）SDS，0.08%（w/v）APS。临使用之前，在 18ml 的 SDS-PAGE 凝胶溶液（WITA，Teltow，德国）中加入 1.2ml 1.28%的 APS。

12）第二向的电极缓冲液：25mmol/L Tris、192mmol/L 甘氨酸、0.1%（w/v）SDS。

注意：溶液要新鲜配制。称取 2.422g Tris 碱，11.52g 甘氨酸和 0.8g SDS，用去离子水定容到 800ml，在量筒中溶解并磁力搅拌。

13）制备固定溶液：50%（v/v）甲醇或乙醇、10%（v/v）醋酸。将 500ml 甲醇或乙醇与 100ml 醋酸、400ml 去离子水相混合。

13.5 第一向（等电点聚焦，IEF）

13.5.1 凝胶条的准备

材　料

下列用于一次电泳（8 个胶条）的化学药品和材料应事先准备好：

— 2 个凝胶灌注装置（WITA，Teltow，德国）

— 1365μl 分离胶溶液（WITA，Teltow，德国）
— 390μl 帽（cap）凝胶溶液（WITA，Teltow，德国）
— 0.8%过硫酸铵（APS）溶液（分离胶需 35μl，cap 胶需 10μl）
— 去离子水
— 巴斯德毛细管
— Gilson 移液管：0～20μl、0～200μl，凝胶加样头
— 8 根封闭边的丙烯线（PP）（WITA，Teltow，德国），直径为 1.4mm
— 凝胶管：内径 1.5mm，长 9.3cm（WITA，Teltow，德国）
— 校准环：从底部，4mm 和 10mm，从顶部，13、17 和 23mm
— 排凝胶气泡的泵
— 定时钟
— Parafilm 膜，剪成小块
— 滤纸条（宽度小于 1.5mm）
— 尺子

步 骤

1）以帽凝胶端（2 个校准环：4mm 和 10mm）朝下，将 4 根玻璃管插入两个凝胶灌注装置的每个托架中，这样玻璃管恰好站在两个分隔室之一的“充填船（filling boat）”上。从玻璃管顶端到玻璃管底端拉入 PP 线（小心，线不易移动），否则以后将不能用它们将胶溶液拉上来。
2）溶解分离胶溶液和过硫酸铵溶液。必须监控凝胶溶液的温度，因为高温下（大于 25℃）聚合作用太快。
3）分离胶溶液除气 4 分钟，在桌子边缘轻弹玻璃管壁，避免产生气泡。
4）融化帽凝胶溶液，除气，步骤同 3。
5）用 Gilson 移液管加 35μl APS 到 1365μl 分离胶溶液中，溶液应小心摇晃，避免氧气进入胶内。
6）将分离胶溶液加到两个凝胶灌注装置的每一个充填船里（每 4 个管 700μl）。所有的玻璃管末端都必须浸没于凝胶溶液中。
7）小心将 PP 线抽出，将凝胶溶液拉上至 23mm 的标记。
8）换充填船分隔室。
9）使用一个Gilson 移液管，加 10μl 0.8% APS 到 390μl 帽凝胶溶液中，轻轻振荡使之混匀。
10）在两个凝胶灌注装置的每个充填船中的空余分隔室内加入 200μl 帽凝胶溶液；凝胶溶液应到达 17mm 的标记。
11）移去充填船，允许凝胶溶液到达 13mm 的标记。经过这一步，有空气进入管子底端和 4mm 标记处。
12）聚合 30 分钟后，将 PP 线抽出，去除凝胶表面未聚合的溶液。在毛细管口部滴加一大滴去离子水，这样在凝胶的上边形成一个潮湿的室，在凝胶和水滴之间形成一个气泡。用此方法形成一个潮湿的室，随后用 Parafilm 膜封上帽凝胶一侧。凝胶在室

温过夜，可以使之进一步聚合。制备好的管子如果保存于室温，可以在第二天使用，或最迟在制备好后第五天使用。

13.5.2 加 样

材 料

化学药品和材料应事先准备好。如果在早晨加样，则阳极溶液和阴极溶液中的尿素应在前一天溶解，磷酸和乙二胺应在临加样前加入。

— 制备好的凝胶管
— IEF 槽（WITA，Teltow，德国）
— 阳极溶液
— 阴极溶液
— 制备好的样品
— Sephadex 溶液（WITA，Teltow，德国）
— 尿素
— 两性电解质混合液（WITA lytes 2－11）
— 覆盖液
— 去离子水
— 巴斯德移液管
— 0～20μl Gilson 移液管
— 0～200μl Gilson 移液管
— 凝胶装填移液管头
— 天平
— 涡旋器
— 滤纸条（宽度小于 1.5mm）

步 骤

1）将乙二胺加入阴极溶液，除气 5 分钟，下槽装阴极溶液。
2）融解 Sephadex 溶液，加入 108mg 尿素和 10μl 两性电解混合液到 100mg Sephadex 胶中，在涡旋器上充分振荡 10～15 分钟。
3）从凝胶灌注装置移走凝胶管，把它们插入聚焦槽的阳极部分，仍应看到 13mm 标记。帽凝胶一端朝上。
4）将阴极溶液加入管子的阴极一边，不要有气泡（事先已除去水）。
5）将聚焦槽的阳极部分安放到聚焦槽的底部，管子必须浸入阴极溶液。
6）除去水，并将加样侧干燥。使用一个伸长的巴斯德移液管或凝胶装填移液管头将水吸去，然后用滤纸条将凝胶表面干燥。
7）融解准备好的样品和覆盖溶液。
8）用凝胶装填移液管头，迅速在胶上覆盖大约 2mm 厚的 Sephadex（见步骤 2）。
9）用一个凝胶装填移液管头，装入样品（1～15μl），加到 Sephadex 表面。加样时，尖

端必须接触 Sephadex 表层，样品应小心加入，避免气泡。

10）使用凝胶装填头，轻轻在样品上加入 5μl 覆盖液并分层，不要使覆盖液和样品相混合。然后在毛细管中加入阳极溶液（新鲜配制，临用前加入磷酸，见 2-DE 溶液），不要引入气泡。

11）所剩的阳极溶液加入上槽，用缓冲液覆盖所有的管子。

13.5.3 IEF 电泳

材　料

— 电源（电压最高达 1000V）
— 方案表
— 定时钟（如果没有可程序设定的电源）

步　骤

电压应分段升高以按下表获得 Vh（电压 × 小时）乘积为 1841：

电压	时间
100V	75 分钟
200V	75 分钟
400V	75 分钟
600V	75 分钟
800V	10 分钟
1000V	5 分钟

13.5.4 凝胶平衡

材　料

— 平衡溶液
— 87%甘油
— 去离子水
— 小 Petri 盘子，直径 5cm
— 有 Peleus 小球的 5ml 玻璃移液管
— 聚丙烯（PP）线，直径 1.5mm（WITA，Teltow，德国）

步　骤

1）融解平衡溶液（在 IEF 结束前1小时）。使用之前，在20ml 平衡溶液中加入0.2g DTT。
2）IEF 结束后，移去管子中的阳极和阴极溶液。
3）用 87%的甘油溶液覆盖帽（cap）凝胶一侧。
4）加 5ml 平衡溶液到 Petri 盘。
5）用 PP 线挤出凝胶：PP 线从帽凝胶一侧插入，管子加样一侧浸入去离子水，小心地

向下挤出凝胶。与此同时可看到水中的覆盖液的溶解。凝胶被拉出 5mm 后，用水迅速清洗挤压端。然后将管子保持在盛有平衡溶液的 Petri 盘子上，整个凝胶被 PP 线拉到盘子里。每个盘子里可平衡两块胶。

6) 室温振荡平衡凝胶 10 分钟整。
7) IEF 之后，如果凝胶并不立刻使用，应倒出平衡缓冲溶液，并在 Petri 盘中 -70℃保存。-20℃保存导致分辨率降低；液氮保存将破坏凝胶。

13.6 第二向（SDS-PAGE）

13.6.1 SDS-PAGE 胶的制备

材　料

所有材料、溶液、试剂必须预先制备。以下数值用于制备两块小胶。琼脂必须 70℃溶解并保存于 40℃直至包埋 IEF 凝胶。使用 4 个 SDS-PAGE 槽，8 块 IEF 凝胶可平行电泳。

— 70%（v/v）乙醇
— 去离子水
— Kimwipes
— Mini-Protean II 电泳槽（BioRad，Munich，德国），包括电极装置、有缆线的盖子、玻璃板（两大两小）、四块隔板（1.5mm）、一对夹紧装置、底部有塑料垫圈的灌装支架。
— 尺子
— 巴斯德移液管
— 琼脂糖溶液
— 18ml SDS-PAGE 凝胶溶液（WITA，Teltow，德国）
— 1.2ml 1.28% APS
— 时钟
— 温控水浴

步　骤

1) 加热琼脂糖溶液至 70℃使之液化。
2) 冷却琼脂糖溶液至 40℃，保持液态。
3) 喷洒 70%乙醇清洗玻璃板和隔板，并用 Kimwipes 刷干净。
4) 融解凝胶溶液和 APS。
5) 将玻璃板夹入夹紧装置，该夹紧装置放在灌装支架的前面狭槽中，这样旋钮对着支架，而“尖角”向上。充分旋转旋钮以使厚的有机玻璃正好对齐后部边缘。这时大玻璃板可以放在有机玻璃板的前面，隔板沿着左边和右边的边缘。插入小板，用拇指轻压玻璃板和隔板以确使玻璃板位于底部。用钳子夹紧做好的“三明治”，后部边缘出现 Newton 环说明旋钮已经非常紧了。不要将旋钮旋得过于紧，否则玻璃板会被夹碎。将三明治从支架抽出，用拇指检查玻璃板和隔板是否与底部齐平。

6）在小玻璃板底部起 6.9cm 处做标记，做为加样的辅助（凝胶长度为 6.6cm）。
7）将凝胶“三明治”装置夹到灌装支架上，旋钮向内，“尖角”向上。在有机玻璃板上加压以使凝胶三明治插入小突起下面。
8）将 18ml 凝胶溶液和 1.2ml APS 相混合，不要有气泡。溶液必须混匀，不要引进氧气。
9）含有凝胶溶液的容器放在加样槽的后面玻璃板上，这样凝胶溶液可以沿着加样槽从玻璃板流下而没有气泡，分离胶被加到标记处。
10）迅速用去离子水覆盖凝胶溶液，以利于聚合并使表面平坦。在凝胶一端用一巴斯德移液管防止搅动凝胶溶液，并使水在凝胶表面均匀地分层。60 分钟后，凝胶可以用于 SDS-PAGE 电泳。

13.6.2 加样

材 料

下列化学药品和材料必须预先准备好：
— 琼脂糖溶液（40℃）
— 电极缓冲液（800ml）
— 第一向电泳的凝胶（IEF 凝胶）
— Mini Protean II 槽（BIoRad，Munich，德国）
— 滤纸
— 小刮勺

步 骤

1）用滤纸条去除凝胶表面的去离子水。
2）将凝胶“三明治”放到电极装置上（旋钮冲外，尖角向上）：首先将凝胶“三明治”放到电极装置的上面部分，向电极装置挤压它使下面一部分固定。
3）在平板凝胶表面加 IEF 凝胶：从平衡缓冲液中取出凝胶条，纵向放到厚有机玻璃板的边缘，尽量使凝胶条与加样槽的边缘靠近。使用小刮勺，将凝胶条轻轻向下推，使之小心的滑入加样槽。凝胶条必须位于 SDS-PAGE 的表面，没有气泡。
4）使用 Pasteur 移液管，将加样槽加满 40℃的琼脂糖溶液（没有气泡），2 分钟后，琼脂糖溶液应凝固。
5）在电极装置装入凝胶“三明治”以后，将 BioRad 槽注入 620ml 电极溶液，加溶液的时侯要避免泡沫和气泡的形成。内槽中电极缓冲液面应到达电极装置中红塑料点的位置。

13.6.3 SDS-PAGE 电泳

材 料

— 电源（150V，100mA，如果是 4 个槽平行电泳则至少 300mA）
— Mini Protean II 槽（BioRad，Munich，德国）

— 方案纸、铅笔
— 时钟（如果电源装置不能设定）
— 手套
— 固定溶液：50%甲醇/10%醋酸/40%水，或 50%乙醇—/10%醋酸/40%水

步 骤

1）在将槽封闭之前，需要确定有机玻璃表面是否干燥，以避免形成“渐进（crawling）”电流，凝胶表面必须覆盖电极缓冲液。
2）电压必须如下表所示分段升高，电流和功率要调到电源的最大值。电流值如表所示并在每一步内逐渐减小。在给定的时间间隔初始和结束的数值如下表所示：

电压	时间	一个槽中的电流（2 块胶）	两个平行槽中的电流（4 块胶）
35V	5 分钟	22 ~ 21mA	44 ~ 42mA
55V	10 分钟	33 ~ 32mA	66 ~ 64mA
100V	15 分钟	59 ~ 48mA	118 ~ 96mA
150V	60 分钟	72 ~ 50mA	144 ~ 100mA

3）SDS-PAGE 结束之后，倒出电极缓冲液，从电极装置中取出凝胶“三明治”。轻微地弯曲隔板，将小玻璃板拉开以取出凝胶。凝胶可以转移到固定溶液中。
注意：使用手套！使用前用水洗去手套上的滑石粉。
4）固定之后，可以采用几种染色方法。

13.7 用考马斯亮蓝 R-250 染色

下面的考马斯亮蓝染色法是由 Eckerskorn（1988）提出的。对 1.5mm 厚的胶，对不同哺乳动物器官的蛋白质复合物只需 100μg 就可得到复杂的 2-DE 图谱。应用考马斯亮蓝染色，每个蛋白质样品最少需要 100ng 才能检测到。

材 料

— 染色的小盘子
— 手套
— 考马斯亮蓝 R-250
— 乙醇：被 1%甲基乙基酮变性
— 甲醇：Merck 6009
— 醋酸

溶 液

下列数量是针对四块 6.5cm×7.5cm 凝胶的染色和脱色。

— 固定溶液：50%乙醇/10%醋酸/40%去离子水（250ml 乙醇 + 50ml 醋酸 + 200ml 去离子水）
— 染色溶液：50%甲醇/10%醋酸/0.05%考马斯亮蓝 R-250（250ml 甲醇 + 50ml 醋酸 + 200ml 去离子水 + 0.25g 考马斯亮蓝 R-250，对新的 Serva blue R-250，只需上述 70%的数量）
— 脱色溶液：5%甲醇/12.5%醋酸/82.5%去离子水（25ml 甲醇 + 62.5ml 醋酸 + 412.5ml 去离子水）
— 保存液：7%醋酸（140ml 醋酸 + 1860ml 去离子水）
— 脱色液和保存液可以通过木炭的过滤作用再生。

步　骤

每种蛋白质的大部分都位于凝胶的内部，要定量染色，染料必须能进入凝胶内部。对含 15%丙烯酰胺的 1.5mm 厚的胶，染色时间最少要 6 小时，定性检测 500ng 以上的蛋白质，染色 1 小时已足够的。对两块 6.5cm × 7.5cm 凝胶，每一种溶液只需 250ml。

1）凝胶在固定溶液中轻微摇荡至少 1 小时。
2）凝胶在染色液中摇荡过夜或至少 1 小时。
3）胶在脱色液中摇荡过夜或至少 1 小时以消除背景。
4）凝胶放于保存液中至少 4 小时以进一步脱色。在最初的 1 小时内换两次溶液，以后每一个小时换一次溶液。

注意：上面的 4 个染色步骤在室温进行，染色时必须要有甲醇溶液，因为 Serva 蓝浓度依赖于这类溶剂。

5）封好的胶置于保存液中，4℃下最少可保存 5 年。

13.8 银　染

通过银染检测聚丙烯酰胺凝胶中的蛋白质是最灵敏的非特异性染色方法，最初由 Merril 等在 1979 年提出，Rabilloud 等在 1994 年做了综述。二胺或氨染色、非二胺化学还原染色和光显影染色这三种不同的染色方法都可采用。非二胺化学还原染色由 Heukershoven 和 Dernick（1985）优化，这种方法是下面将说明的方法的基础。对在这里用的 1.5mm 厚的 2-DE 凝胶是最佳的（Jungblut and Seifert 1990）。这种方法比光显影染色灵敏度高，与二胺银染灵敏度相同，但更简单。2-DE 凝胶中含有 1～10ng 蛋白质的斑点即可检测到。在 6.5cm × 7.5cm 的 2-DE 凝胶上，最少加入 15μg 的蛋白质混合物（如从人类心脏得来）就足以检测到 100 种蛋白质。

材　料

— 染色的盘子（不透明或透明的白色塑料或玻璃盘子）
— 手套
— EDTA（TitriplexIII；Merck，Darmstadt，德国）
— 乙醇（Merck，Darmstadt，德国）
— 甲醛（35%，Merck，Darmstadt，德国）

— 电子显微镜检测用的戊二醛（25%，Merck，Darmstadt，德国）
— 乙酸（Merck，Darmstadt，德国）
— 乙酸钠（Merck，Darmstadt，德国）
— 无水碳酸钠（Merck，Darmstadt，德国）
— 无水碳酸氢钠（Merck，Darmstadt，德国）
— 硫代硫酸钠（Merck，Darmstadt，德国）
— 硝酸银（Merck，Darmstadt，德国）
— 硫柳汞（Sigma，St.Louis，美国）

溶　液

所给的量适用于 4 块 6.5cm × 7.5cm 凝胶。除了固定液，所有的溶液都是在使用前临时制备，新鲜制备的戊二醛对染色来说是非常重要的。戊二醛在 4℃20ml 等份分装保存。

— 固定液：50%乙醇/10%醋酸/40%去离子水（1000ml 乙醇 + 200ml 醋酸 + 800ml 去离子水）
— 保温液：30%乙醇/0.5mol/L 醋酸钠/0.5%戊二醛/0.2%硫代硫酸钠（300ml 乙醇 + 68.04g 醋酸钠 + 20ml 25%戊二醛 + 2g 硫代硫酸钠，用去离子水定容到 1000ml）
— 硝酸银溶液：0.1%硝酸银/0.01%甲醛
在 1000ml 去离子水中溶解 1g 硝酸银，加入 288μl 35%甲醛。
— 显影液：2.5%碳酸钠（pH11.3）/0.05%硫代硫酸钠/0.01%甲醛
将 25g 碳酸钠和 12mg 硫代硫酸钠溶于去离子水，并用去离子水定容到 1000ml。加入 288μl 35%甲醛，用碳酸氢钠调 pH 值为 11.3。
— 定影液：0.05mol/L EDTA（Titriplex III；Merck，Darmstadt，德国）/0.02 %硫柳汞（18.612g EDTA 加去离子水到 1000ml，加入 200mg 硫柳汞）

步　骤

所有的步骤都在恒定的室温下进行，特别是显影步骤。对两块 6.5cm × 7.5cm 的凝胶，下列每一种溶液只需 250ml。

1）将固定液中的凝胶摇荡过夜或至少 1 小时
2）将保温液中的凝胶轻微摇荡 2 小时
3）去离子水清洗凝胶 3 次，每次 20 分钟
4）将硝酸银溶液中凝胶轻微摇荡 30 分钟
5）用去离子水快速洗胶 30 秒
6）将定影液中凝胶摇荡 5 ~ 30 分钟，时间由所加的蛋白质量决定
7）如果已经达到所需的颜色深度，将凝胶放到定影液中最少 15 分钟
8）换定影液。在暗处，4℃定影液中凝胶可保存几个月

13.9 清洗 IEF 管

用于等电聚焦的管子必须有严格的内径，否则，用 PP 线灌注和去除凝胶就不能进行。因为这种机械上的原因以及为了避免阴极漂移现象，内部表面必须没有任何杂质。因此下列清洗程序必须严格遵守。

材　料

500ml 玻璃烧杯
100ml 玻璃烧杯
用惰性材料制成的稳定的线
Deconex 12 PA（Borer Chemie，Zuchwil，Switzerland）
0.1mol/L 盐酸
去离子水
镊子
加热板

步　骤

1）IEF 之后，用去离子水充分地清洗管子。
2）加热 500ml 0.6% Deconex 溶液至 60～80℃。
3）将玻璃管子浸入 Deconex 溶液，70℃下放置 3 次 10 分钟：每 10 分钟之后，分别用镊子移走玻璃管，倒出清洗液，加入新的清洗液，再于 70℃下清洗 10 分钟。
4）用去离子水浸洗管子。
5）加热 500ml 0.1mol/L 盐酸至 95℃。
6）将管子放到一个玻璃烧杯中，加 0.1mol/L 盐酸，直到将烧杯加满并覆盖管子。将管子在盐酸溶液中 95℃放置 30 分钟。
7）用去离子水清轻洗管子，然后干燥。

13.10 结　　果

这里描述的 2-DE 技术广泛运用于研究原核生物和真核生物，图 13.2 和图 13.3 是两个例子。通过 2-DE 可以比较 6 个分化阶段蛋白质的组成来了解真菌 *Uromyces viciae-fabae* 从孢子向吸器母细胞的发育过程（Deising et al. 1991）。研究一些蛋白质斑点的消失、一些新蛋白质的合成、另一些蛋白质表达量增高或降低。研究小鼠脑的蛋白质，阐明两个近交系小鼠之间的遗传变异。为了提高分辨能力，在 2-DE 之前先进行生物的和生物化学的初步分离。在线粒体（Jungblut and Klose 1985）、核（Jungblut et al. 1989）、细胞质和膜中的蛋白质、肝素结合蛋白质（Jungblut and Klose 1986）、染料结合蛋白质和金属结合蛋白质的定性分析中，1%的蛋白质表现了遗传变异性，而定量的遗传变异的范围是 10%。小鼠脑中找到的 5 种蛋白质（Eckerskorn et al. 1988；Jungblut et al. 1992）

示于图 13.3。人类心肌层蛋白质的一个银染 2-DE 图谱示于图 13.4，这个图谱包含有 500 个斑点，其中 100 个点已被确认（Jungblut et al. 1994）。在已确认的蛋白质中，有一些已被阐明，α-晶状体球蛋白质 B、苹果酸脱氢酶、肌酸激酶和热休克蛋白质 27 已被证明与扩张性心肌病有关并且含量有变化（Knecht et al. 1994；Otto et al. 1994）。

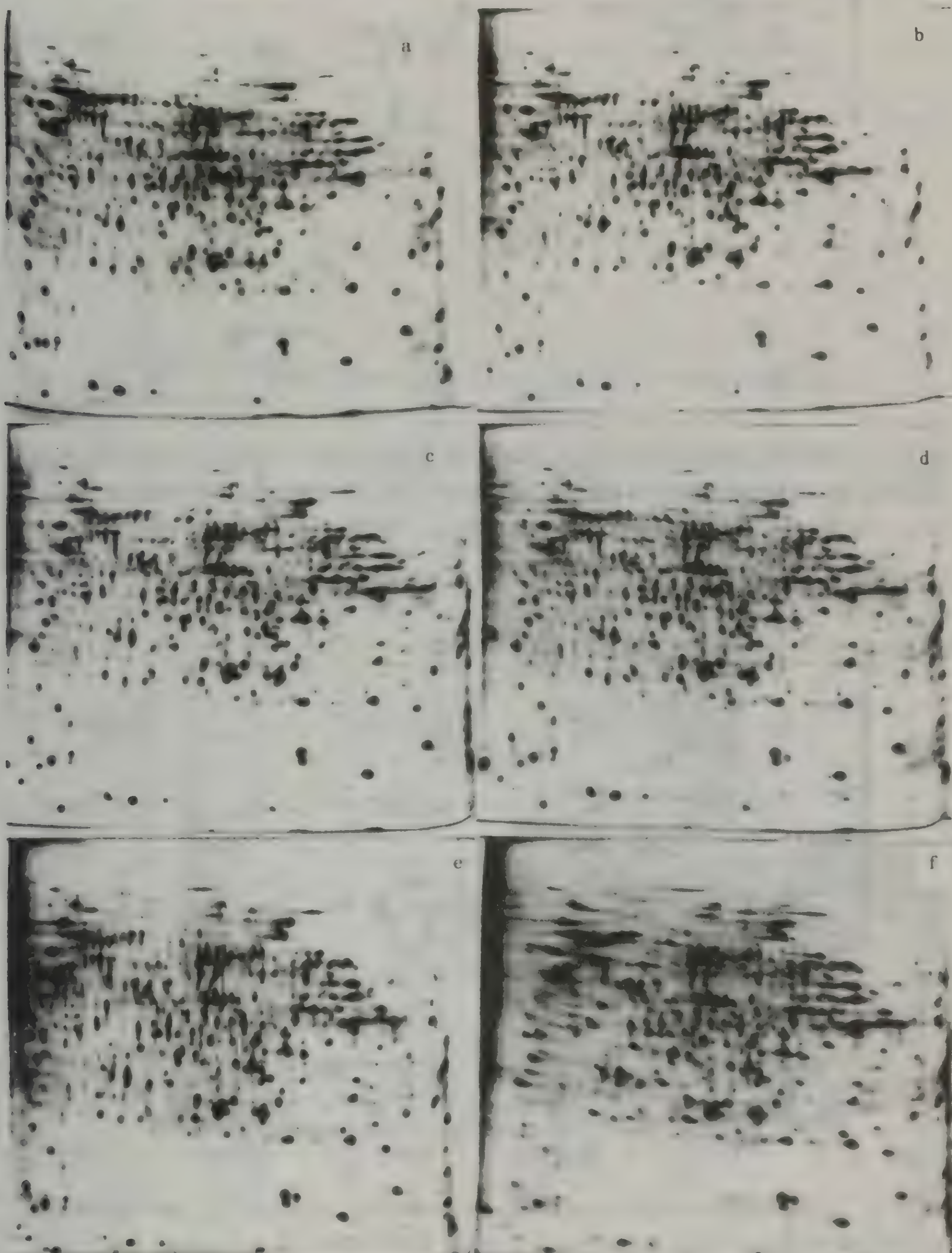


图 13.2　a～f 银染 2-DE 图谱，(a) *Uromyces viciae-fabae* 夏孢子；(b) 芽管，和感染结构经分化 7 小时 (c)，9 小时 (d)，18 小时 (e) 和 24 小时 (f)。

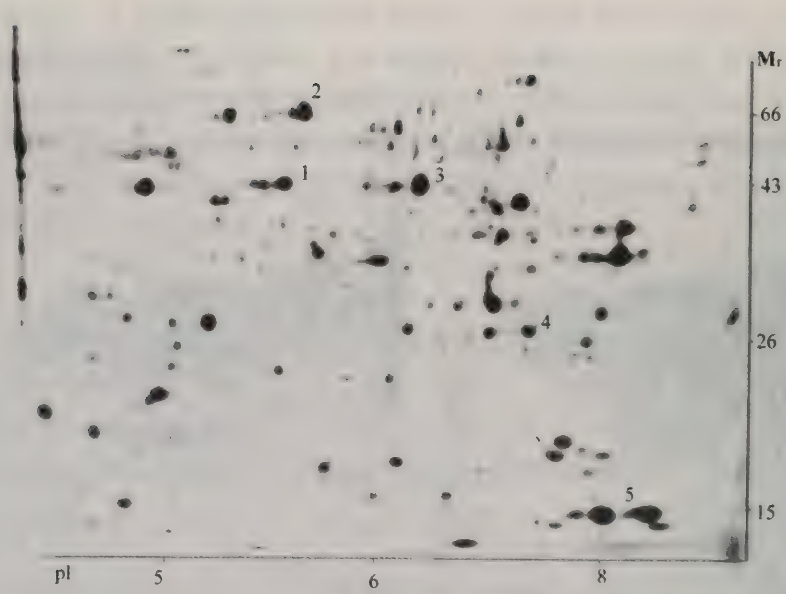


图 13.3 小鼠脑蛋白质考马斯亮蓝 R-250 染色 2-DE 图谱。在 IEF 中加入 140μg 蛋白质。使用内部标记蛋白质校正等电点和分子量。用数字标明 5 个经 N-端测序和/或氨基酸分析的蛋白质。1，肌动蛋白；2，血清白蛋白；3，肌酸激酶；4，磷酸丙糖异构酶；5，β-血红蛋白。

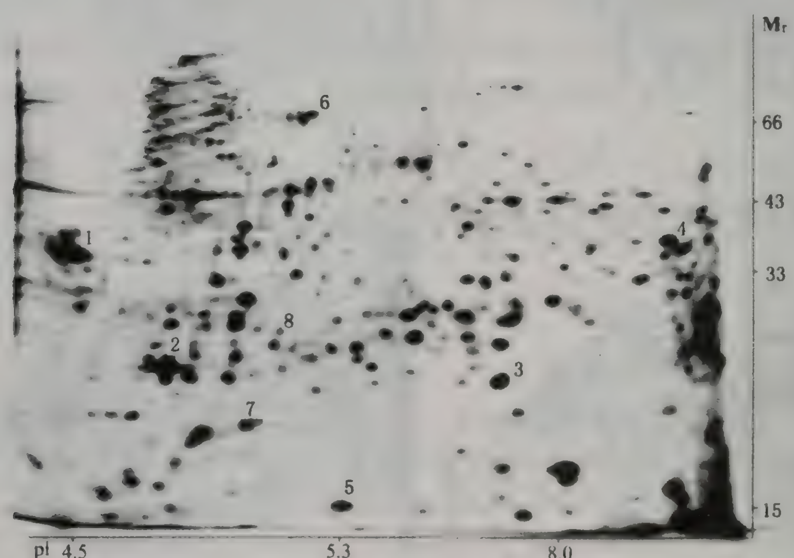


图 13.4 人心肌层蛋白质的银染 2-DE 图谱。在 IEF 中共加入 50μg 蛋白质。使用内部标记蛋白质校正等电点和分子量。在 100 个经 N 端分析、测序和质谱分析的蛋白质中，8 个蛋白质用数字标明：1，tropomyosin；2，肌球蛋白轻链；3，α-晶状体蛋白 b；4，甘油醛磷酸脱氢酶；5，脂肪酸结合蛋白；6，血清白蛋白；7，苹果酸脱氢酶；8，热休克蛋白 27。

使用本文所述的 2-DE 技术，到目前为止所进行的所有分析都得到了复杂的电泳图谱，只有一个例外。这个例外就是大肠杆菌的核糖体蛋白质，这些蛋白质呈极端碱性，使用的 pH 梯度并不是最佳的。两性电解质梯度的斜率在 pH5 ~ 7 范围内偏低，在 pH3.5 ~ 5和 pH7 ~ 10范围内偏高。然而，核糖体蛋白质可通过减少 Vh 乘积至1/4来分析。

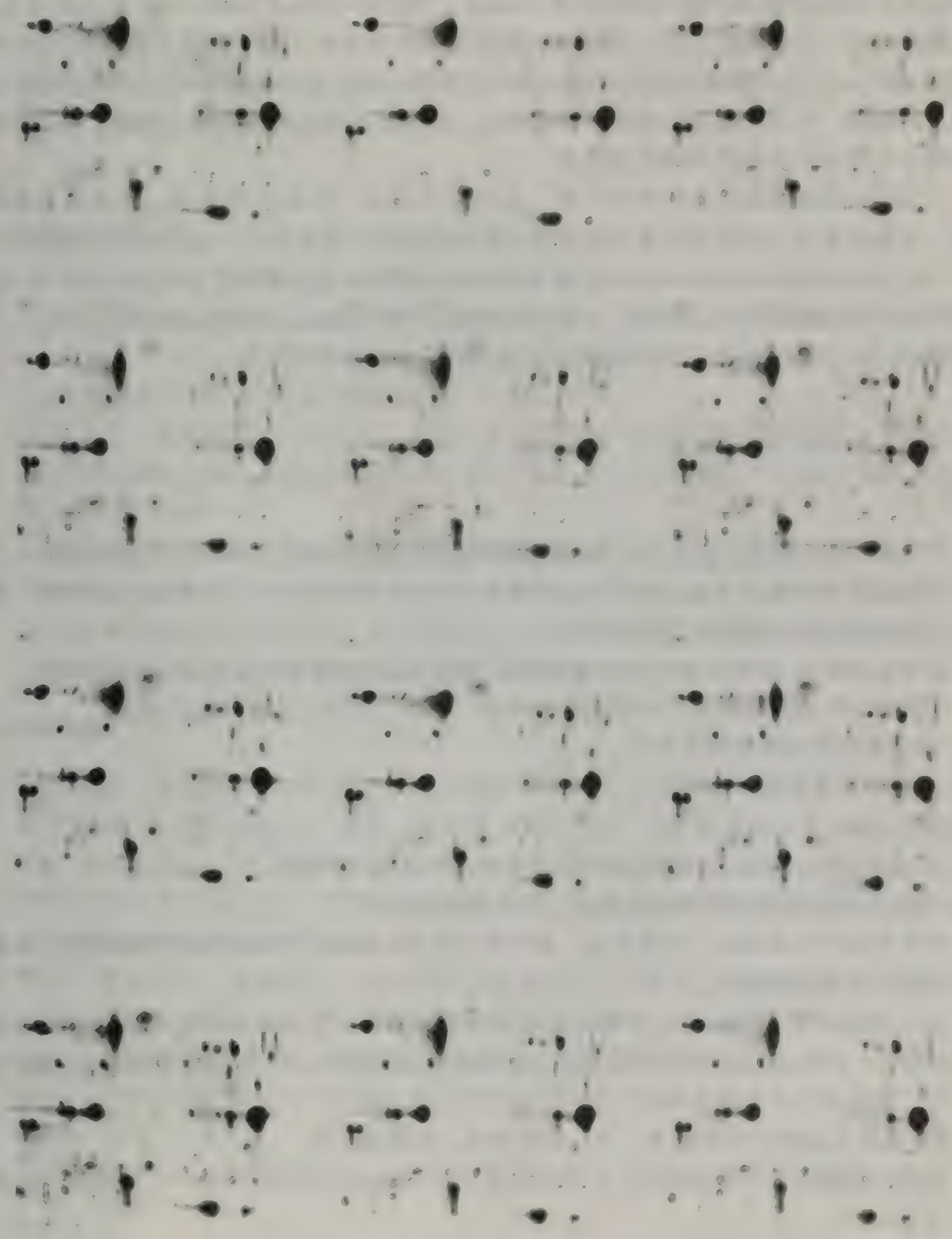


图 13.5　小鼠脑 2-DE 部分图谱的重复性。在 IEF 中共加入 140μg 蛋白质。用考马斯亮蓝 R-250 染色。部分图谱示于图 13.3，包括肌酸激酶和血清白蛋白。共上样 12 次。

好的重复性是减法分析的先决条件，在2-DE技术中可稳定地获得。图13.5所示的小鼠脑蛋白质图谱是一个学生在经过两个月强化训练之后12次可重复获得的。

应用表面电极测量pH值，或通过将凝胶切下一块，超声波破碎后测量悬浮液的pH值来校正pI值（Klose and Kobalz 1995）。也可使用标准蛋白质来校准pI值，通常使用天然状态下的pI值或通过序列计算得来的pI值，而忽略在9mol/L尿素溶液中pI的变化。必须标明每一次校正的方法。人类的心脏原肌球蛋白质和人的α-血红蛋白质pI值分别是4.5和8.7，在上述条件下可以得到很好的校正。通过在分离胶的阴极一侧使用低孔隙度的帽胶，许多碱性蛋白质停留在帽胶内。若阴极区染色很深且斑点无法分辨，则意味待分析样品中含有很多碱性蛋白质。

可通过标准蛋白质来校准分子量，准确率为10%。但是必须知道，由于翻译后修饰，有些时候蛋白质的分子量并不能通过氨基酸序列计算来得到。这里所提到的最适于2-DE的标记蛋白质可从BioRad获得（Munich，德国）。蛋白质分子量在14 000~66 000范围内时可得到最佳的分辨率，如图13.4中脂肪酸结合蛋白质和血清白蛋白所示。分子量在10 000~100 000范围内的蛋白质可得到较好的分辨率。

13.11 疑难解答

IEF

- 聚合之后IEF凝胶中的气泡：凝胶应更好地脱气和聚合更长的时间。形成气泡的一个原因是聚合时温度太高，在临用之前将管子在4℃预冷半小时可得到较低的温度，聚合时避免将凝胶放在阳光下。
- 在等电聚焦时，阴极溶液中的尿素会结晶：提高室温。温度低于20℃时，尿素会结晶。
- 阴极侧IEF凝胶断裂表示有阴极飘移效应。下面这些建议会缓解这个问题：

— 用上面提到的程序清洗管子。
— 用新的凝胶溶液。
— 减少APS。
— 将IEF的每一步从75分钟减少到60分钟，来降低Vh乘积。
— 有时侯阴极飘流现象与样品有关，重新准备样品。

- 等电聚焦时电流太高：封垫老化，旋钮没有旋紧，或者阳极溶液滴到阴极溶液。旋紧旋钮，更换阴极溶液。
- 在2-DE的水平方向上蛋白质斑点没有分开或有污染：使用新的两性电解质溶液和凝胶溶液，样品必须是清澈的溶液。一些位点容易形成条纹，如在心肌层蛋白质图谱中，肌动蛋白容易形成条纹。
- IEF凝胶在融解之后被毁坏：在-70℃冷冻，在室温融解。
- 膜蛋白质没有进入IEF凝胶：在样品溶液以及Sephadex和凝胶溶液中，使用2%NP-40或Chaps。

SDS-PAGE

- 在运行SDS-PAGE时电流太高：在阳极和阴极之外存在其他电流通路。停止电泳，打

开槽上的盖子，将阳极和阴极之间的突出塑料部分擦干。

- 在运行 SDS-PAGE 时电流太低：阴极和阳极之间没有连接好。停止电泳，打开盖子，在槽中的阳极部分加入电极缓冲液，以使凝胶被电极缓冲液覆盖，将阴极部分也加入电极缓冲液使之与阳极部分平齐。
- 分子量低于 20 000 的蛋白质不能分离：SDS-PAGE 凝胶的孔隙度太高或分离胶中的 pH 值太低。在 2-DE 模型中，0.1 个 pH 单位的变化就会造成很大的影响。提高丙烯酰胺浓度，检查分离胶的 pH 值。温度也显著影响 Tris 缓冲液的 pH 值（温度升高 pH 值降低）。

银 染

- 斑点的强度太低：
  — 样品中蛋白质的量不足。提高样品浓度或在等电聚焦时增大样品的体积。
  — 由于旧的戊二醛、清洗步骤太长、或显影液的 pH 值不对，会造成银染的失败。使用适合于电子显微镜的新鲜的戊二醛（Merck，Darmstadt，德国），如所述正确清洗并精确调节显影液的 pH 值。
- 背景太高：显影液的 pH 值太高，显影液中没有加硫代硫酸盐。另一个原因是染色的盘子没有清洗干净。用蒸馏水、70%乙醇和 Silvosol（Roth，FRG）仔细地清洗，提高银染溶液的体积。
- 即使显影很长时间后，仍然只有低强度的黄色斑点出现：显影液中没有加甲醛。
- 凝胶中有点状条纹，点状条纹很细而强，但很集中，垂直条纹长度达到 10cm。有时它们以 10~20 条纹成束出现。仔细地清洗 SDS-PAGE 凝胶的玻璃板，也可用烷基化方法或在第二向电泳前在温育液中用二硫苏糖醇还原。

2-DE 凝胶

- 低重复性：在最短的时间内仔细根据说明来训练自己的实验能力。对 8 个样品来说，应 15 分钟内加完 Sephadex、样品、覆盖液和阳极溶液。IEF 凝胶的温育时间应保持恒定，在融解之后，IEF 凝胶溶液应立即用于第二向凝胶。使用预先制成的凝胶溶液。
- 胶的底部有暗的云状物：旧的两性电解质。70℃固定一小时可以将其去除。使用含新的两性电解质溶液的新的凝胶溶液。
- 图谱上没有高分子量蛋白质：蛋白质被降解为多肽，如被蛋白质酶降解。如果样品太陈旧，使用新的样品。改变样品的制备方法以阻止降解（别的蛋白酶抑制剂）。生物材料应始终保存在 -70℃，尤其是在样品制备之前。
- 斑点上方有不明标志：将 IEF 凝胶聚合时间延长至 3 天。

（朱学勇 译　施蕴渝 校）

参 考 文 献

Aebersold RH, Teplow DB, Hood LE, Kent SB (1986) Electroblotting onto activated glass: High efficiency preparation of proteins from analytical sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels for direct sequence analysis. J Biol Chem

261: 4229–4238

Aebersold R, Laevitt J (1990) Sequence analysis of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis: Towards an integrated protein database. Electrophoresis 11: 517–527

Baker CS, Corbett JM, May AJ, Yacoub MH, Dunn MJ (1992) A human myocardial two-dimensional electrophoresis database: Protein characterisation by microsequencing and immunoblotting. Electrophoresis 13: 723–726

Deising H, Jungblut PR, Mendgen K, (1991) Differentiation-related proteins of the broad bean rust fungus Uromyces viciae-fabae, as revealed by high resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. ArchMicrobiol 155: 191–198

Eckerskorn C, Jungblut P, Mewes W, Klose J, Lottspeich F (1988) Identification of mouse brain proteins after two-dimensional electrophoresis and electroblotting by microsequence analysis and amino acid composition analysis. Electrophoresis 9: 830–838

Görg A, Postel W, Günther S (1988) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis 9: 531–546

Harrington MG, Lee KH, Yun M, Zewert T, Baley JE, Hood L (1993) Mechanical precision in two-dimensional electrophoresis can improve protein spot positional reproducibility. Appl Theor Electrophoresis 3: 347–353

Heukeshoven J, Dernick R (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. Electrophoresis 6: 103–112

Jungblut P, Schneider W, Klose J. (1984) Quantitative analysis of two-dimensional electrophoretic protein patterns: Comparison of visual evaluation with computer-assisted evaluation. In: Neuhoff V (ed), Electrophoresis'84, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, pp 301–303

Jungblut P, Klose J, (1985) Genetic Variability of proteins from mitochondria and mitochondrial fractions of mouse organs. Biochem Genet 23: 227–245

Jungblut P, Klose J (1986) Composition and genetic variability of Heparin-Sepharose CL-6B protein fractions obtained from the solubilized proteins of mouse organs. Biochem Genet 24: 925–939

Jungblut P, Prehm J, Klose J (1987) An attempt to resolve all the various proteins of a single human cell type by two-dimensional electrophoresis. J Biol Chem Hoppe-Seyler 367: 439

Jungblut P, Zimny-Arndt U, Klose J (1989) Composition and genetic variability of proteins from nuclear fractions of mouse (DBA/2J and C57BL/6J) liver and brain. Electrophoresis 10: 464–472

Jungblut PR, Seifert R (1990) Analysis by high-resolution two-dimensional electrophoresis of differentiation-dependent alterations in cytosolic protein pattern of HL-60 leukemic cells. J Biochem Biophys Meth 21: 47–58

Jungblut P, Dzionara M, Klose J, Wittmann-Liebold B, (1992) Identification of tissue proteins by amino acid analysis after purification by two-dimensional electrophoresis. J Prot Chem 11: 603–612

Jungblut P, Otto A, Zeindl-Eberhart E, Pleißner K-P, Knecht M, Regitz-Zagrosek V, Fleck E, Wittmann-Liebold B (1994) Protein composition of the human heart: The construction of a myocardial two-dimensional electrophoresis database. Electrophoresis 15: 685–707

Kaltschmidt E, Wittmann HG (1970) Ribosomal proteins. VII Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins. Anal Biochem 36: 401–412

Kamp RM, Wittmann-Liebold B (1984) Purification of Escherichia coli 50 S ribosomal proteins by high performance liquid chromatography. FEBS Lett 167: 59–63

Klose J (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis in mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. Humangenetik 26: 211–234

Klose J, Kobalz U (1995) Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome.

Electrophoresis 16: 1034–1059
Knecht M, Regitz-Zagrosek V, Pleissner K-P, Jungblut P, Hildebrandt A, Fleck E (1994) Characterization of the myocardial protein composition in dilated cardiomyopathy by two-dimensional gel electrophoresis. Europ Heart J 15 Supplement D: 37–44
Merril CR, Switzer RC, Van Keuren ML (1979) Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. Proc Natl Acad Sci USA 76: 4335–4339
Nokihara K, Morita N, Kuriki T (1992) Applications of an automated apparatus for two-dimensional electrophoresis, Model TEP-01, for microsequence analyzes of proteins. Electrophoresis 13: 701–707
O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 250: 4007–4021
Otto A, Benndorf R, Wittmann-Liebold B, Jungblut P, (1994) Identification of proteins on two-dimensional gels for the construction of a human heart 2-DE database. J Prot Chem. 13: 478–480
Pappin DJC, Hojrup P, Bleasby AJ (1993) Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. Curr Biol 3: 327–332
Prehm J, Jungblut P, Klose J (1987) Analysis of two-dimensional electrophoretic protein patterns using a video camera and a computer II. Adaption of automatic spot detection to visual evaluation. Electrophoresis 8: 562–572
Rabilloud T, Vuillard L, Gilly C, Lawrence JJ (1994) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: A general overview. Cell Mol Biol 40: 57–75
Raymond S (1964) Acrylamide gel electrophoresis. Ann NY Acad Sci 121: 350–365
Scheele GA (1975) Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins. J Biol Chem. 250: 5375–5385
Smithies O, Poulik MD (1956) Two-dimensional electrophoresis of serum proteins. Nature 177: 1033
Stegemann H, Francksen H, Macko V (1973) Potato proteins: Genetic and physiological changes, evaluated by one- and two-dimensional PAA-gel-techniques. Z Naturforsch 28c: 722–732
Vandekerckhove J, Bauw G, Puype M, Van Damme J, Van Montagu M (1985) Protein-blotting on polybrene-coated glass-fiber sheets. A basis of acid hydrolysis and gas-phase sequencing of picomole quantities of protein previously separated on SDS-polyacrylamide gel. Eur J Biochem. 152: 9–19
Zeindl-Eberhart E, Jungblut P, Otto A, Rabes HM (1994) Characterization of tumor-associated protein variants during hepatocarcinogenesis in the rat. J Biol Chem 269: 14589–14594

第 14 章

疏水膜的半干式印迹法

P. Jungblut

14.1 引　言

聚丙烯酰胺是用于分离蛋白质的一种非常好的介质，但是对于除分子量与等电点以外的性质鉴定却无能为力。大多数蛋白质在凝胶洗脱时会有高达 90% 的损失。引入硝酸纤维素膜（NC）作为蛋白质印迹和固定的介质后，就可以进行广泛的性质鉴定反应。第一个膜固定蛋白质是利用免疫染色进行鉴定的（Towbin et al. 1979；Burnette 1981）。其他的涂层技术有凝集素染色法鉴别糖蛋白（Clegg 1982），放射性钙离子涂层（Maruyama et al. 1984）或 GTP 涂层来鉴定 GTP-结合蛋白（McGrath et al. 1984）。但是，蛋白质化学研究却无法直接在聚丙烯酰胺凝胶中进行，硝酸纤维素（NC）膜也不适应 N 末端测序。因此将双向电泳（2-DE）与蛋白质化学方法相结合的一个重要进展便是发现一种可将蛋白质高效印迹于其上的惰性膜。首先出现的测序稳定的膜是由经过带正电基团（Vandekerckhove et al. 1985；Aebersold et al. 1986）或疏水不带电基团（Eckerskorn et al. 1988a）修饰的玻璃纤维膜，或纯有机聚合物比如聚偏二氟乙烯（PVDF）（Matsudaira 1987）或聚丙烯（PP）（Eckerskorn and Lottspeich 1990；Jungblut et al. 1990）。以后测试了不同的疏水膜与不同的蛋白质的印迹效率，优化了印迹参数，提出了印迹机理（Jungblut et al. 1990）。Eckerskorn 与 Lottspeich（1993）比较了这些膜对测序的适用性。

表 14.1　影响蛋白质从 SDS 凝胶中转移出来的参数

	参数	改进方法
蛋白质	分子量	减小
SDS 凝胶	SDS 的浓度	提高
	聚丙烯酰胺的成分	减小
	电泳后的离子强度	减小
印迹缓冲液	离子强度	减小
	甲醇浓度	降低
	pH	提高
印迹条件	电流强度	提高
	时间[a]	延长

a. 只有对于带 SDS 的蛋白质，延长时间才有利于转移。如果在印迹缓冲液中加入了 SDS，进一步延长时间将十分有用。

第一个印迹实验是在印迹槽中完成，而半干式印迹最早由 Kyhse-Andersen 于 1984 年报道的。它具有更易操作、缓冲液用量少及因此污染少的特点。

表 14.2 影响蛋白质与疏水膜结合的参数

	参数	改进方法
蛋白质	分子量	增大
SDS 凝胶	SDS 浓度	降低
	电泳后离子强度	提高
印迹缓冲液	离子强度	提高
	甲醇浓度	增加
	pH	降低
印迹条件	电流强度	减小
	时间	无影响[a]
膜类型:	疏水性	增大

a. 提高印迹时间不会移走与膜结合的蛋白。

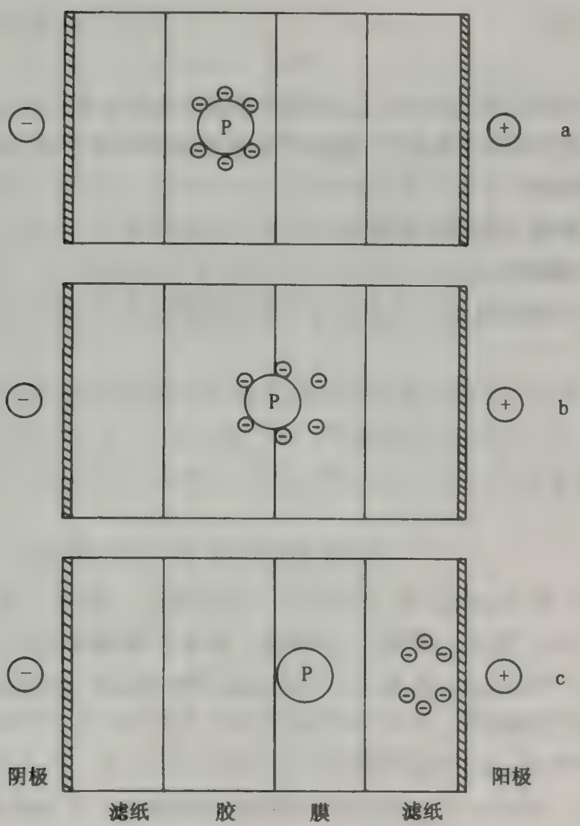


图 14.1　a～c　印迹机理。a.在 SDS 凝胶中的蛋白质(P)带有 SDS(用小圈来表示)。b.SDS-蛋白质复合物由凝胶中移向印迹膜,在转移过程中 SDS 部分从蛋白质上脱离。c.蛋白质通过没结合 SDS 的氨基酸部分与膜由疏水相互作用结合,接着 SDS 完全从蛋白质上脱离。蛋白质与膜结合,而 SDS 移向正极。细节见正文。

印迹的效率取决于蛋白质从胶上转移到膜上的效率以及蛋白质与膜结合的效率。表14.1 列出了一些影响蛋白质从凝胶中转移效率的参数以及一些改善转移的建议。表14.2 列出了一些影响蛋白质与膜结合的参数以及一些改善结合的建议。

图 14.1 所描述的印迹机理与上述表中所描述的参数影响是一致的。在印迹实验开始时，蛋白质是位于凝胶内部，并带有 SDS。SDS 的负电性使得 SDS-蛋白复合物移向正极。在移动过程中，SDS 不断地从蛋白质上脱离。当蛋白质到达疏水膜时，一些疏水结合位点不带有 SDS 时，可以与膜发生疏水相互作用。蛋白质结合到膜上，SDS 不断地从蛋白质上脱离并移向正极而蛋白质则留在了膜上。这个机理与实验中观察到只增加印迹时间不会导致膜上蛋白质的损失的现象是一致的。高分子量的蛋白质可能在离开凝胶之前就丧失了 SDS，印迹时间的增加不会提高印迹效率，因为不带负电的蛋白质不能从凝胶中移出，所以印迹时间的增加只有在将 SDS 加入到阴极印迹缓冲液中时才有意义。而低分子量的蛋白质移动很快，在到达膜的时候仍有部分 SDS 分子没有脱离，这样便不能建立起与膜的疏水作用力，结果是无结合地穿膜而过。

14.2 流　　程

SDS-PAGE 电泳后应立即进行印迹。如果采用的是15% 浓度、1.5mm 厚并按照 Laemmli (1970)的方法准备的聚丙烯酰胺凝胶，凝胶在印迹缓冲液中的平衡是可以省略的。

— SDS-PAGE 凝胶电泳
— 用三层阳极滤纸准备“印迹三明治”
— 停止 SDS-PAGE 凝胶电泳
— 依次用膜、凝胶与阴极滤纸，完成制作“印迹三明治”
— 印迹
— 染色

14.3 材　　料

设　备

— 半干式转印室：如 Sartoblot II（Satorius，Heidelberg，德国，石墨）；Trans-Blot SD（BioRad，Munich，德国，阴极：不锈钢，阳极：镀锑的铂）；Pharmacia-LKB（石墨；Parmacia，Freiburg，德国）；Schleicher 和 Shuell（Carboglass；Schleicher 和 Shuell，Dassel，德国）
— 滤纸，Schleicher 和 Shuell，426 892 003
— PVDF：Immobilon（Millipore，Eschborn，德国）；Transblot（BioRad，Munich，德国）；Problot（Perkin Elmer Applied Biosystems，Weiterstadt，德国）；硅化玻璃纤维（SGF）：Glasssybond（Biometra，Göttingen，德国）
— 凝胶：2-DE 凝胶，1.5mm
— 去离子水
— 剪刀

— 手套
— 玻璃棒，移液管
— 圆盘
— PVDF
— 甲醇（Merk，Darmstadt，德国，用于 PVDF）
— 丙酮（用于 Glassybond）
— 印迹缓冲液：50mmol/L 硼酸盐/20%甲醇（pH9.0）。对 1L 溶液：加 3.09g 硼酸（Merck，Darmstadt，德国），750ml 去离子水，200ml 甲醇，18.6ml 1mol/L NaOH。用去离子水定容至 1L。

14.4 步　骤

1）在双向电泳结束之前 30 分钟准备膜。
1a）PVDF：在甲醇中浸泡 20～30 秒。
1b）SGF：在丙酮中浸泡 20～30 秒。
将膜在印迹缓冲液摇荡三次，每次 5 分钟。
2）用去离子水清洗印迹槽。石墨电极在印迹过程之前应一直保持潮湿状态。
3）在双向电泳结束之前 5 分钟准备阳极侧"三明治"：将三层滤纸一层一层卷着放到阳极上。滤纸伸出凝胶每一边约 3mm。用移液管滚压滤纸挤出气泡。
4）将膜小心地向上放好，不要卷曲膜片。在凝胶放上去之前，膜是不能变干。
5）双向电泳结束后，将 2-DE 凝胶直接放在膜上面。然后，在凝胶上一层一层放上三层滤纸。每一层都经过卷压来赶走气泡。"三明治"不应太湿，在凝胶与膜之间也不应有液体。
6）关闭印迹槽。如果印迹槽用的是石墨电极，可在槽上面放 1kg 重物使其下沉。
7）初始印迹条件：电流强度为 $1mA/cm^2$（即，每 $55cm^2$ 的凝胶 55mA，或每 $110cm^2$ 的凝胶 110mA）印迹3小时；电压限制在100V 以内。在印迹过程中，电压由6V 升到20V。

14.5 疏水膜上的蛋白质非特异性染色

14.5.1 考马斯亮蓝 R-250

疏水膜的考马斯亮蓝 R-250 染色可适应测序的要求，其灵敏度高于 Poinceau S，并可与 sulforhodamine B 相比。如无蛋白质损失染色不易去掉。以下过程是基于 Eckerskorn 等（1988）方法，但它不适用于硝酸纤维素膜。

溶　液

— 染色液：0.1% Serva blue R-250/40% 甲醇/10%醋酸。对于500ml 溶液：加1g Serva blue R-250，400ml 甲醇，100ml 醋酸（Merck，Darmstadt，德国），用去离子水定容至500ml。
— PVDF 脱色液：40%甲醇/10%醋酸。对于 1L 溶液：400 ml 甲醇，100 ml 醋酸（Mer-

ck，Darmstadt，德国)，500 ml 去离子水。

— SGF 脱色液：30%甲醇/10%醋酸。对于 1L 溶液：300 ml 甲醇，100 ml 醋酸（Merck，Darmstadt，德国)，600 ml 去离子水。

步　骤

对于 6.5cm×7.5cm 的印迹膜，每步 100 ml 染色液及脱色液足够。

1）在染色液中小心摇晃膜片 5 分钟。

2）再在脱色液中小心摇晃膜片三次，每次 5 分钟。

3）将膜挂起凉干或放在几层滤纸上吸干。

14.5.2　sulforhodamine B

sulforhodamine B 染色可适应测序的要求，并可用于基质辅助激光解吸电离质谱分析中。灵敏度可与考马斯亮蓝 R-250 相比。以下过程是基于 Coull 和 Pappin（1990）方法，它不适用于硝酸纤维素膜。

溶　液

— 染色液：30%的甲醇，0.2%（v/v）醋酸，0.005%（w/v）sulforhodamine B。对于 500ml 溶液：150ml 甲醇（Merck，Darmstadt，德国，uvasol)，1ml 醋酸，25mg sulforhodamine B。用去离子水定容至 500ml。

步　骤

对于 6.5cm×7.5cm 的印迹膜，100 ml 染色液足够。

1）在印迹完成后，直接用去离子水清洗膜以除去缓冲液。

2）将膜完全干燥（在室温下过夜或置于干燥器中)。

3）将干燥的膜在染色液中摇荡 1～2 分钟。

4）在去离子水中对膜脱色几秒钟。

14.5.3　Poinceau S

Poinceau S 染色是可逆的并可用于硝酸纤维素膜和疏水性膜。它可用于免疫染色前的蛋白质定位。但由于灵敏度低，不适于测序与质谱。以下过程是基于 Salinowich 和 Montelaro（1986）的方法。

溶　液

— 染色液：0.5% Poinceau S，1%醋酸。将 0.5g Poinceau S 溶解于 100ml 1%醋酸中。

步　骤

对于 6.5cm×7.5cm 的膜，100 ml 染色液足够。

1）印迹完成后，将膜放在染色液中染色5分钟。
2）在蒸馏水中浸泡2~3分钟以脱去背景。
3）对蛋白质印迹点做标记。
4）用蒸馏水清洗5~10分钟，使膜完全脱色，包括蛋白质点。

14.5.4 免疫染色

结合到膜上的蛋白质的特异性染色已有了许多报道，以下的免疫染色过程容易操作，所产生的红色染色斑点直观可见并且长时间保持稳定。封闭和染色过程都可用于硝酸纤维素膜与PVDF膜。以下方法是基于Pluzek和Ramlau（1988）的报道。

材　料

— 与将被染色的膜大小相同的玻璃或塑料槽
— 振荡混合器
— Tris/NaCl：100mmol/L Tris-HCl（pH7.5），135mmol/L NaCl
— 含磷酸缓冲液的盐（PBS，pH7.4）：20ml 1mol/L KH_2PO_4，80ml 1mol/L K_2HPO_4，45g NaCl。用去离子水加到5L。
— PBS/Tween：1L PBS（pH7.4），3g Tween-20
— PBS/Tween/DM 3%：100ml PBS/Tween，3g脱脂干奶粉（DM）
— 溶液1：0.8mol/L Tris（9.6912gTris；终体积用重蒸水加到100ml）
— 溶液2：0.4 N HCl（40ml 1mol/L HCl，60ml重蒸水）
— 溶液3：0.048 mol/L $MgCl_2$（2.033g $MgCl_2 \times 6H_2O$；终体积用重蒸水加到100ml）
— 底物缓冲液：50.0ml溶液1，53.6ml溶液2，4.1ml溶液3，用重蒸水加到100ml。终体积为207.7ml，pH8.0
— 底物
注意：底物在临用前混合，反应须在暗处进行。
— 萘酚（Sigma，St. Louis，美国）（-20℃保存）：0.4mg/ml底物缓冲液
— Fast Red（Sigma，St.Louis，美国）（-20℃保存）：0.6mg/ml底物缓冲液
每种溶液混合相同体积。
— 第一抗体。应知道动物来源和抗体的Ig族。依据抗体的不同，按1:20到1:10 000的比例用PBS/Tween/DM 1%稀释抗体。（例如，兔抗人肌红蛋白的抗体：稀释1:10 000）
— 与碱性磷酸酶相结合的第二抗体。抗体必须来自与取得第一抗体不同的物种并且可与第一抗体相结合。用PBS/Tween/DM 1%稀释第二抗体（例如，碱性磷酸酶山羊抗兔IgG Fc，可被稀释到1:5000）。

印迹膜的饱和

所有步骤都在振荡器上完成。
1）印迹完成后，用Tris/NaCl洗膜清洗三次，每次10分钟，以除去盐类、SDS及甘氨酸。

2）将膜放入 PBS/Tween 中进行封闭反应，时间至少 1 小时，有时要反应过夜。
3）在 PBS/Tween 中洗膜 3 次，每次 10 分钟。
4）将膜干燥或直接用于免疫染色。

免疫染色过程

1）将饱和的并清洗过的膜置于第一抗体溶液中 4℃过夜。
注意：干燥的疏水膜如 PVDF，在临用抗体温育之前须浸入甲醇中湿润。
2）在 PBS/Tween 中洗膜三次，每次 10 分钟。
3）室温下温育第二抗体和膜 1 小时。
4）用 PBS/Tween 中洗膜 3 次，每次 10 分钟，继续洗涤，直到泡沫消失为止。
5）在底物缓冲液中预温育底物 10 分钟。
6）底物的温育：将底物缓冲液中的底物（萘酚或 Fast Red）加到膜上并用肉眼观察控制蛋白质的染色；当染色强度达到要求时，用去离子水终止反应，用滤纸将膜干燥。

14.6 结　　果

疏水膜印迹法已用于不同来源的经双向电泳分离的蛋白质的分析鉴定。图 14.2 是 PVDF 膜上部分小鼠脑蛋白质的图谱。此例中使用了高效双向电泳系统（23cm × 30cm ×

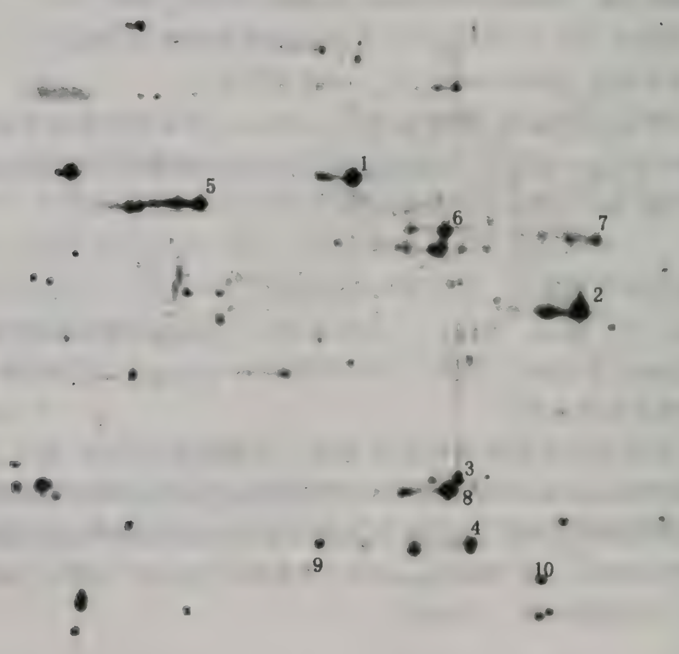


图 14.2　印迹到 PVDF 膜上的小鼠脑蛋白质的部分高效 2-DE 图谱。蛋白质由考马亮蓝 R-250 染色。43 种蛋白质通过氨基酸分析得到鉴定，图中标出了其中 10 种：1. 肌酸激酶 2. 甘油醛磷酸脱氢酶 3. 碳酸酐酶 4. 磷酸丙糖异构酶 5. 肌动蛋白 6. 果糖二磷酸酶 7. 丙酮酸脱氢酶 8. 磷酸甘油酸变位酶 9. 胸苷激酶 10. 谷胱甘肽转移酶。

0.15cm）来进行蛋白质分离。膜用考马斯亮蓝 R-250 染色。其中一些蛋白质已用直接 N 端测序（Eckerskorn et al. 1988）来鉴别，而另一些蛋白质用氨基酸分析法（Jungblut et al. 1992）来鉴定。一些已鉴别的蛋白质样品已在图上标记出来。同样的技术已应用于人心肌蛋白的内部序列测定及鉴定小鼠肿瘤相关蛋白（Zeindl-Eberhart et al. 1994）。对于基质辅助激光解吸/电离质谱，优先使用 sulforhodamine 染色，并在一张心肌 2 - DE 蛋白质图谱上鉴别出 15 种蛋白（Thiede et al. 1996）。在此情况下，也可观察到翻译后的修饰。

可用免疫染色检测微生物抗原。已用小胶 2 - DE 技术分离布氏疏螺旋体（*Borrelia burgdorferi*）蛋白质并已在一个病人的血清中寻找到的布氏疏螺旋体蛋白质的抗体。血清做为第一抗体并使用了上面所述的底物。免疫印迹示于图 14.3。病人体内含有抗约 40 种布氏疏螺旋体蛋白质的抗体。

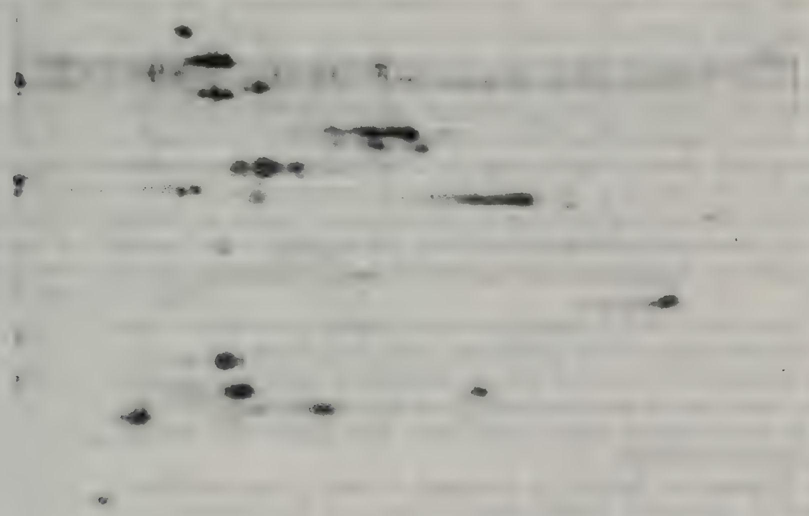


图 14.3　人血清抗布氏疏螺旋体蛋白质的免疫印迹图。用小胶 2-DE 技术分离布氏疏螺旋体蛋白质。将 2-DE 样品印迹到 PVDF 膜上。在免疫染色中患包柔氏病（borreliosis）的病人血清作为第一抗体。萘酚及 Fast Red 作为底物。

14.7　疑难解答

- 膜上出现滴状污迹（卷状物）：印迹“三明治”太湿了。在印迹“三明治”的组装过程中，尽可能将印迹缓冲液挤出去。
- 电压上升太快，而电流却太低：印迹“三明治”太干燥。检查确信疏水膜已被甲醇预浸湿。
- 高分子量蛋白质仍留在凝胶里。
  — 降低印迹缓冲液中的甲醇浓度

— 降低印迹缓冲液的离子强度

— 增大电流强度

— 在阴极缓冲液中加入 SDS，并延长印迹时间

• 低分子量蛋白质不能与膜结合。

— 提高印迹缓冲液的甲醇浓度

— 降低印迹缓冲液的离子强度

— 减小电流强度

— 采用疏水性更强的膜

（朱学勇 译　施蕴渝 校）

参考文献

Aebersold RH, Teplow DB, Hood LE, Kent SB (1986) Electroblotting onto activated glass: High efficiency preparation of proteins from analytical sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels for direct sequence analysis. J Biol Chem 261: 4229–4238

Burnette WN (1981) Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. Anal Biochem 112: 195–203

Clegg JCS (1982) Glycoprotein detection in nitrocellulose transfers of electrophoretically separated protein mixtures using concanavalin A and peroxidase: Application to arenavirus and flavivirus proteins. Anal Biochem 127: 389–394

Coull JM, Pappin DJC (1990) A rapid fluorescent staining procedure for proteins electroblotted onto PVDF membranes. J Prot Chem 9: 259–260

Eckerskorn C, Jungblut P, Mewes W, Klose J, Lottspeich F, (1988) Identification of mouse brain proteins after two-dimensional electrophoresis and electroblotting by microsequence analysis and amino acid composition analysis. Electrophoresis 9: 830–838

Eckerskorn C, Mewes W, Goretzki H, Lottspeich F (1988) A new siliconized glass-fiber as support for protein-chemical analysis of electroblotted proteins. Eur J Biochem 176: 509–519

Eckerskorn C, Lottspeich F (1990) Combination of two-dimensional gel electrophoresis with microsequencing and amino acid composition analysis: Improvement of speed and sensitivity in protein characterization. Electrophoresis 11: 554–561

Eckerskorn C, Lottspeich F (1993) Structural characterization of blotting membranes and the influence of membrane parameters for electroblotting and subsequent amino acid sequence analysis of proteins. Electrophoresis 14: 831–838

Jungblut P, Eckerskorn C, Lottspeich F, Klose J (1990) Blotting efficiency investigated by using two-dimensional electrophoresis, hydrophobic membranes and proteins from different sources. Electrophoresis 11: 581–588

Jungblut P, Dzionara M, Klose J, Wittmann-Liebold B, (1992) Identification of tissue proteins by amino acid analysis after purification by two-dimensional electrophoresis. J Prot Chem 11: 603–612

Jungblut P, Otto A, Zeindl-Eberhart E, Pleißner K-P, Knecht M, Regitz-Zagrosek V, Fleck E, Wittmann-Liebold B (1994) Protein composition of the human heart: The construction of a myocardial two-dimensional electrophoresis database. Electrophoresis 15: 685–707

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680–685

Khyse-Andersen J (1984) Electropblotting of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J Biochem Biophys Meth 10: 203–209

Maruyama K, Mikawa T, Ebashi S (1984) Detection of calcium binding proteins by ^{45}Ca autoradiography on nitrocellulose membrane after sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. J Biochem 95: 511–519

Matsudaira P (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. J Biol Chem 262: 10035–10038

McGrath JP, Capon DJ, Goeddel DV, Levinson AD (1984) Comparative biochemical properties of normal and activated human ras p21 protein. Nature 310: 644–649

Pluzek K-J, Ramlau J (1988) In: Bjerrum OJ, Heegaard NHH(eds) Handbook of immunoblotting of proteins, vol 1. CRC Press, Inc, Boca Raton, FL: 177

Salinowich O, Montelaro R (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Anal Biochem 156: 341–347

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76: 4350–4354

Vandekerckhove J, Bauw G, Puype M, Van Damme J, Van Montagu M (1985) Protein-blotting on polybrene-coated glass-fiber sheets. A basis of acid hydrolysis and gas-phase sequencing of picomole quantities of protein previously separated on SDS-polyacrylamide gel. Eur J Biochem 152: 9–19

Thiede B, Otto A, Zimny-Arndt U, Müller E-C, Jungblut P (1996) Identification of human myocardial proteins separated by two-dimensional electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Electrophoresis 17:588–599

Zeindl-Eberhart E, Jungblut P, Otto A, Rabes HM (1994) Characterization of tumor-associated protein variants during hepatocarcinogenesis in the rat. J Biol Chem 269: 14589–14594

第五部分
氨基酸的分析

第 15 章

高灵敏度氨基酸分析

R. M. Kamp

15.1 引　言

氨基酸分析广泛应用于许多研究和工业领域，如生物化学、生物技术、诊断学、神经生物学及质量控制。氨基酸可在生物样品中以游离分子状态存在，且可以在被研究的样品中直接测定。蛋白质和肽内的氨基酸可以通过对样品完全酸水解或碱水解进行测定。蛋白质有 20 种 α - 氨基酸。已经从不同的生物样品中鉴定出 150 多种氨基酸及其衍生物。

氨基酸分析首先是由纽约洛克菲勒大学的 Standford Moore 和 William Stein 提出的。氨基酸可以用一个磺酸化的阳离子交换柱在 4 ~ 6 小时内分离开。用茚三酮（ninhydrin）进行柱后衍生化的检测极限为 10nmol（Spackman 1958）。这种方法提供了极高的再现率和精确度。近几年，高效液相色谱（HPLC）被广泛应用于氨基酸分析，利用柱前荧光试剂衍生化，并利用反相柱进行分离。这种方法的主要优点是快速、灵敏度高。

15.2 应　用

15.2.1 利用柱前衍生化进行氨基酸分析

在过去的 20 年中，HPLC 在生物医学研究中的应用大大增加，新的反相色谱和离子交换柱的迅速发展使 HPLC 应用于氨基酸的测定方面。

现代 HPLC 仪器和分离柱已经提高了灵敏度，即从 nmol 到 pmol 或 fmol 水平，缩短了分离时间，从数小时到数分钟，且保持了高的分辨率。

HPLC 的出现和柱前衍生化技术的发展提供了建立新方法的选择。图 15.1 所示的是利用柱前衍生化的 HPLC 氨基酸分析仪的流程图。可用不同的试剂做柱前衍生化来进行氨基酸分析。这些包括：

- ortho-phthaldialdehyde（OPA）（邻苯二醛）
- 9-fluorenylmethyl chloroformate（FMOC-Cl）（9-芴基甲基氯甲酸酯）
- 4-chloro-7-nitro-2，1，3-benzoxadiazole（NBD-Cl）（4 -氯- 7 -硝基- 2，1，3 -苯噁二唑）
- 4-(dimethylamino) azobenzene-4-sulfonyl chloride（dabsyl chloride）（4 -（二甲氨基）偶氮苯- 4 -磺酰氯）

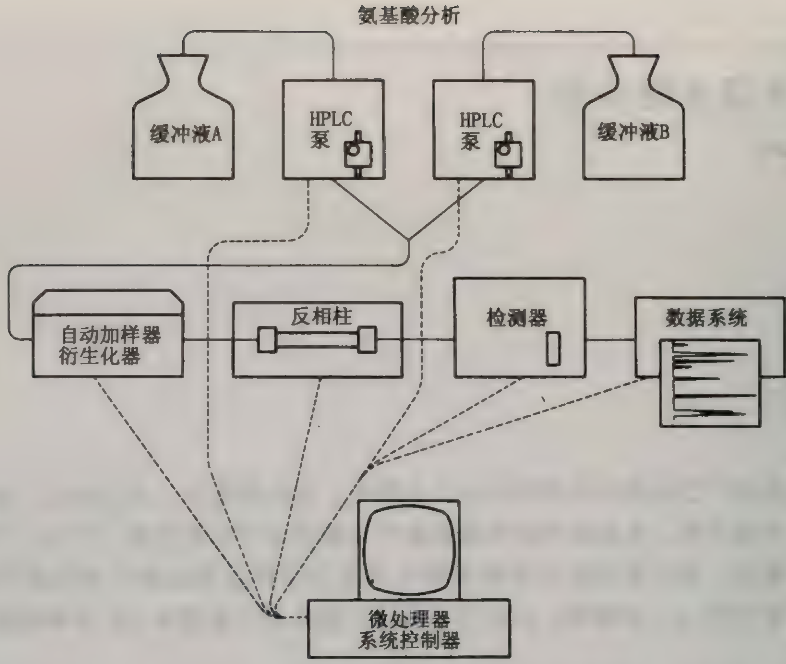


图 15.1　柱前衍生化 HPLC 氨基酸分析仪。

- 6-aminoquinolyl-N-hydroxy-succinimidyl carbamate（AQC）（6-氨基喹啉-N-羟基-琥珀酰亚氨基氨基甲酸酯）

OPA 衍生化

在 1971 年，Roth 提出了 OPA 与氨基酸反应作为对传统茚三酮方法的一种替代(Roth 1972)。通过荧光，OPA 的衍生物在低的 pmol 或 fmol 水平也可以检测。OPA 与主要的氨基酸在 pH 9～10 范围内进行反应，并形成发荧光的异吲哚（isoindoles)。OPA 方法提供了高的再现性，并可用于常规分析。OPA 直接衍生化的一个缺点是只有主要的氨基酸可以检测，但是有几种方法可以避免这种问题。次要的氨基酸可以利用 FMOC, dabsyl chloride 或 phenylisothiocyanate（异硫氰酸苯酯）进行检测，这些试剂与主要的和次要的氨基酸反应。OPA 衍生物在 1～2 分钟内稳定，但随后迅速降解。为了获得 OPA 反应的最好再现率，应使用全自动系统。

FMOC 衍生化

FMOC 首次作为氨基酸衍生物化试剂由 Einarsson 于 1983 年提出。这种方法利用荧光检测可进行高灵敏度氨基酸分析。FMOC 是高度发荧光且水解成醇。任何过量的与氨基酸反应后的 FMOC 副产物必须在 HPLC 系统分离之前除去。一种方法是利用戊烷、己烷或戊烷和乙酸乙酯的混合物抽提副产物。用戊烷抽提能较好地除去 FMOC 醇，但也除去了不定量的氨基酸。第二种方法依赖于与金刚烷的反应。FMOC 与金刚烷反应形成一

种疏水复合物，它在色谱终了时才被洗脱下来，因此，不影响氨基酸衍生物的鉴定。FMOC 衍生物灵敏度高，易于实施，且能确定主要的和次要的氨基酸。这种方法的一个缺点是不适宜于色氨酸和半胱氨酸的测定：由于分子内的荧光淬灭，使得色氨酸或半胱氨酸 FMOC 衍生物的反应很低。尽管如此，这些衍生物仍可在紫外光下检测，但灵敏度很低。

用 NBD-Cl 进行脯氨酸和羟脯氨酸选择性测定

柱前 NBD-Cl 衍生化法可作为 OPA 确定仲胺法的一种补充（Carisano 1985）。利用 NBD-Cl 可进行脯氨酸和羟脯氨酸选择性确定。在医学研究中通常有必要选择性确定血清、胶原蛋白水解物或组织及组织浸出液中的脯氨酸和羟脯氨酸，如在慢性肾衰竭（chronic kidney failure）的诊断中。Palmerini（1985）第一次描述了选择性的确定仲胺。下面描述的是一种改良方法，可用于氨基酸与 OPA/NBD-Cl 混合物以下面方式进行反应。OPA 与主要的氨基酸迅速反应，并且无 2-巯基乙醇，不形成荧光衍生物。NBD-Cl 同时与仲胺反应，它们的衍生物用荧光进行检测。次要的氨基酸选择性测定方法迅速、简便，可在 5 分钟内完成分离。

NBD-Cl 衍生物稳定，但其灵敏度与 OPA 或 FMOC 衍生物相比，低近 100 倍，但在低 pmol 水平检测 NBD 氨基酸仍是可能的。

Dabsyl chloride

Dabsyl chloride 是由 Chang 于 1981 年介绍的用于手工衍生化氨基酸分析及 HPLC 分离的方法（Chang 1983）。Dabsyl chloride 与伯胺和仲胺反应形成带有桔黄色的衍生物，这些衍生物在 436nm 处可被检测，且在数月内稳定。这种方法同时可以检测伯胺和仲胺。其灵敏度是低 pmol，其缺点是在柱寿命短。过量的 dabsyl chloride 试剂不断地与衍生物化的样品注入柱子中，它们粘在柱子上而引起变质。

AQC 衍生化

在 1994 年，Millipore 公司（USA）介绍了使用 AQC 迅速而简单地进行氨基酸分析。这种试剂与主要和次要的氨基酸形成稳定的衍生物。这些衍生物通过反相 HPLC 在不到 35 分钟内分开。AQC 在形成氨基喹啉（aminoguindine AMQ）过程中被消耗掉，形成的 AMQ 具有不同于任何衍生化的氨基酸的光谱特性，因此，不会影响氨基酸分析的定性和定量。这种反应简单，几秒钟内发生。氨基酸可以注入 HPLC，而不需要进一步的样品准备。

15.2.2 柱后衍生化

经典的氨基酸分析作为柱后衍生化进行介绍。用一个磺酸化的阳离子柱分离氨基酸。这种方法提供了最高的再现率和精确度。柱后衍生物化与 HPLC 离子交换柱分离氨基酸相结合，为定量常规分析提供了所必须的高速度和高灵敏度。用从 pH3 到 pH10 的连续梯度系统将氨基酸从 HPLC 柱上洗脱下来。氨基酸分离后，用 OPA 进行在线衍生

化，但这只能检测主要的氨基酸。因此，要用次氯酸盐进行附加反应。

只有当脯氨酸和羟脯氨酸到达反应器时才能供给次氯酸盐，否则所有主要的氨基酸的荧光将会急剧减少。它与亚氨基酸反应，且形成一种易于接近荧光试剂 OPA 的物质。与所有主要的氨基酸的平均浓度相比，脯氨酸的荧光反应到达 50% ~ 60% （Kamp 1990）。柱后衍生化氨基酸分析仪的流程图见图 15.2。

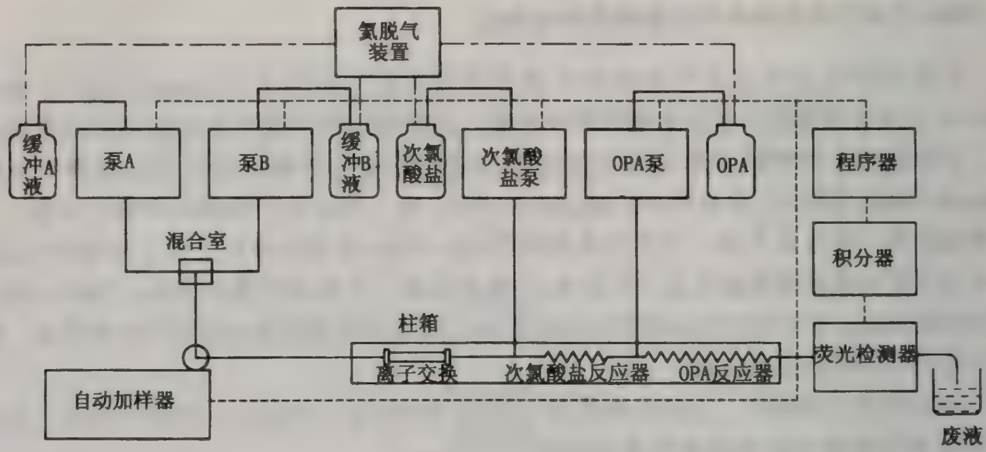


图 15.2 柱后衍生物化氨基酸分析仪。

15.3 材料和方法

HPLC 系统

— HPLC 设备：2 泵 M6000A，Millenium 软件（均来自于 Waters，Milford．MA）；荧光检测器（Shimadzu，Duisburg，Germany）；自动上样器 Promis II（Spark，Ve Emmen，Holland）

15.3.1 OPA 柱前衍生化

试剂与缓冲液

— 柱子：反相柱 C18 Hypersil（250mm × 4mm；Knauer，Berlin，Germany）

— OPA 试剂：100μg ortho-phthaldialdehyde 溶于 1000μl 甲醇，60μl β-巯基乙醇和 9ml 1mol/L 硼酸（pH 10.4）。

— 样品缓冲液：16.9g 柠檬酸钠（19.6g 柠檬酸钠 × $2H_2O$），20ml 硫代二甘油（thiodiglycol），30ml 巯基乙醇，用水定容至 1L（pH2.2）。

HPLC 缓冲液

— 缓冲液 A：90% 12.5mmol/L 磷酸氢二钠（pH 6.5）和 10% 甲醇。

— 缓冲液 B：甲醇和 3%（v/v）四氢呋喃（tetrahydrofuran）

衍生化反应

为了获得好的再现率，只能用一个全自动衍生化系统，如自动上样器（Promis II）。要用新配制的 OPA 溶液进行氨基酸衍生化。这种溶液应每周配一次，贮于 –20℃。

1）氨基酸标准品或待分析样品用样品缓冲液稀释到终浓度 100pmol/10μl。
2）氨基酸反应用自动上样器 Promis II 在室温下自动进行，反应 1 分钟。试剂与样品比（v/v）为 1∶1（每个 10μl）。
3）分离梯度条件：在 1 分钟内由 15% B 到 20% B；在 12 分钟内由 20% B 到 32% B；在 10 分钟由 32% B 到 60% B；3 分钟内由 60% B 到 90% B；2 分钟内由 90%B 到 15%B；15%B 相当于 85%A，20%B 相当于 80%A。

流速为 1.0ml/分钟，柱箱温度 50℃。荧光检测：340nm 处激发，在 455nm 处发射。

图 15.3 所示为生理氨基酸标准品在下列条件下的分离结果：

4）注射 10μl 含 100 pmol 氨基酸标准品的样品缓冲液，重新开始梯度。
5）校正 HPLC 系统。
6）注射约 20 pmol 蛋白水解物，开始梯度。
7）计算氨基酸的组成。

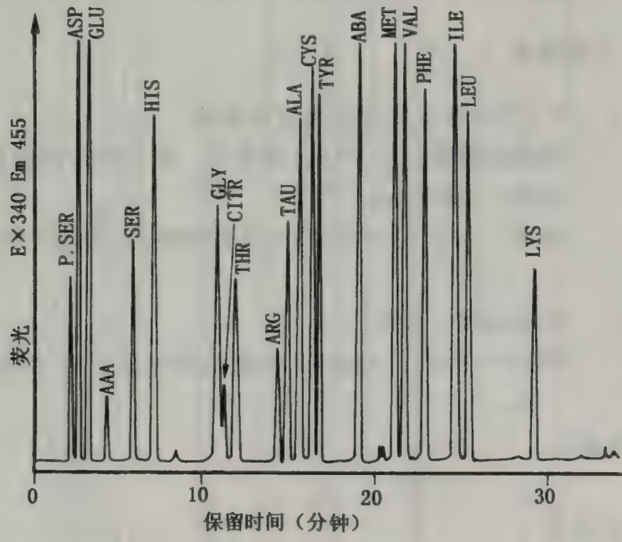


图 15.3　50pmol 生理氨基酸标准品用 OPA 柱前衍生化后在反相 C18 柱上的分离。P-SER：磷酸丝氨酸；Citr：瓜氨酸；AAA：氨基乙二酸；ABA：氨基丁酸。

15.3.2　NBD-Cl 柱前衍生化

材料

— HPLC 系统：同 OPA 柱前衍生化（见上文）
— 反相 C18 柱，250mm×4mm（Hypersil）

— 溶于甲醇中的 5mmol/L/ml NBD - Cl
— 溶于 0.1mol/L 硼酸钠（pH10.4）中的 7.5mol/L/ml OPA
— HPLC 缓冲液 A：78% 50mmol/L 醋酸钠（pH7.0）甲醇溶液
— HPLC 缓冲液 B：25% 200mmol/L 醋酸钠（pH7.0）甲醇溶液

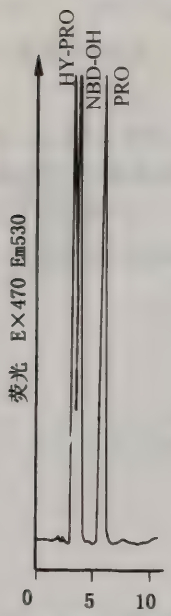


图 15.4　100pmol 的标准氨基酸用 NBD-Cl 衍生化后在 Hyrersil C18 柱(250mm×4mm)上的分离(详见正文)。

衍生化过程

1）氨基酸标准品或样品用 0.1mol/L 硼酸钠（pH10.4）在 Eppendorf 管中稀释到浓度为 100pmol/10μl。用 10μl 样品进行衍生化。
2）吸 10μl 溶于甲醇中的 5mmol/L/ml NBD - Cl 到氨基酸标准品或样品中。
3）加 10μl 溶于 0.1mol/L 硼酸钠（pH10.4）中的 7.5μmol/L/ml OPA（无巯基乙醇）。
4）将样品在加热块或烤箱中 60℃下保温 5 分钟。
5）注射 100pmol 氨基酸标准品测定 HPLC 柱（反相 C18 柱，250mm×4mm）的柱效。
6）校正 HPLC 系统。
7）保温（步骤 4）和降温后，将样品注射到 HPLC 柱中。

分离条件

8）用下列条件分离衍生化的氨基酸：
荧光检测器：在 470nm 处激发，在 530nm 处发射
流速：0.3ml/min
梯度：在 10 分钟内由 0%B 到 50%B；在 2 分钟内由 50%B 到 0%B
柱箱温度：30℃
图15.4 所示为 100pmol 的氨基酸标准品在上述条件下分离的结果。
9）计算氨基酸的组成。

15.3.3　FMOC 衍生化

材料

— HPLC 系统（见上文）
— 反相 C18 柱，250mm×4mm（见上文）
— 溶于乙腈的 2.5mmol/L FMOC - Cl 溶液
— 溶于 0.5mmol/L 硼酸的 10mmol/L ADAM（金刚烷胺，1-adamantanamine）（pH7.7）
— 戊烷
— HPLC 缓冲液 A：80% 的 50mmol/L 醋酸钠乙腈溶液（pH4.1）
— HPLC 缓冲液 B：30% 的 50mmol/L 醋酸钠乙腈溶液（pH4.2）

衍生化过程

1）将干样品（约 100pmol）溶于 100μl 0.5mmol/L 硼酸中（pH7.7）。

2）将 FMOC－Cl 溶于乙腈中，浓度为 2.5mmol/L。

3）吸 100μl FMOC－Cl 溶液放到样 100μl 品溶液中，小心混合。

4）室温下反应 1 分钟。

5）异戊醇抽提或 ADAM 反应，除去多余的试剂。

5a）小心地混合后，用 1.5ml 异戊醇抽提。抽提 10 分钟后，去除上相。用 1.5ml 异戊醇再抽提一次；仔细混合，并使其分离 10 分钟。去除含有多余试剂的上相。位于下

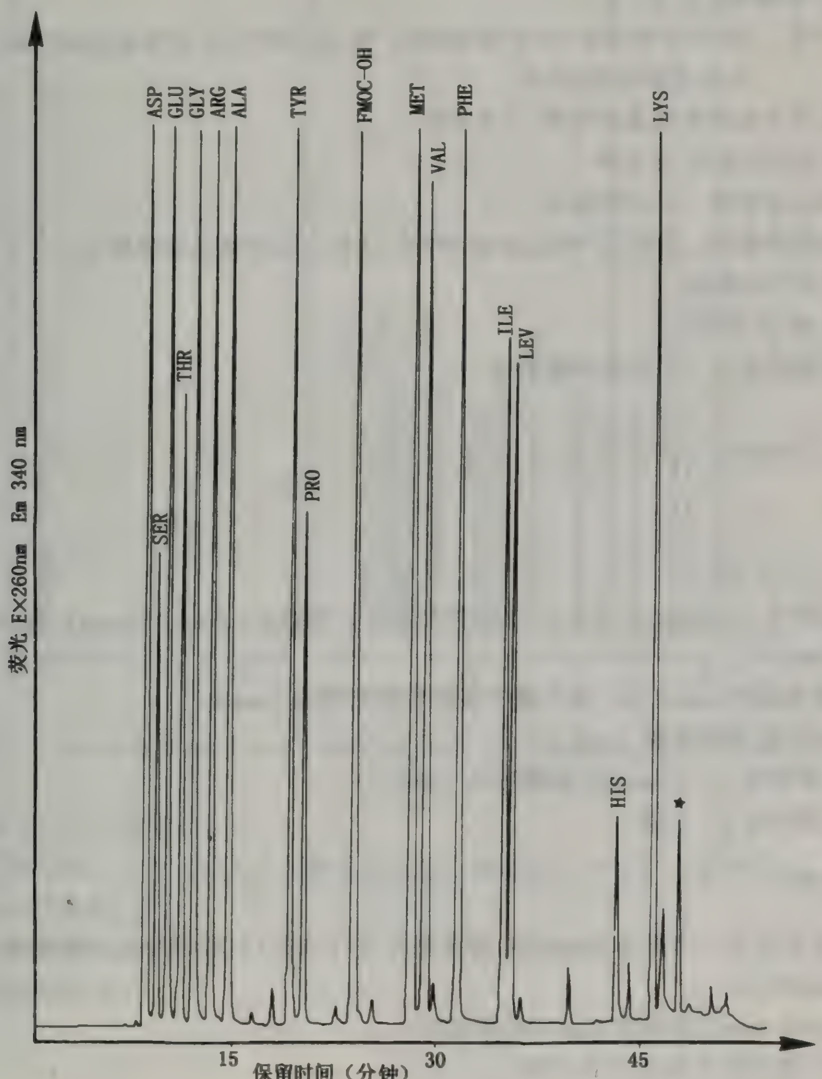


图 15.5 在柱前用 FMOC 衍生化分离 50pmol 氨基酸标准品的分离，并用异戊醇抽提的结果（详见正文）。

面一相中的氨基酸，可用于以后的氨基酸分析。

5b）对于 ADAM 反应时，准备10mmol/L ADAM 的0.5mmol/L 的硼酸溶液（pH7.7）。吸取 100μl 10mmol/L 的 ADAM 溶液放到 FMOC 衍生化的样品中，让其在25℃反应10 分钟。

6）在 HPLC 系统上分离衍生化的氨基酸。

分离条件

7）利用下列条件分离氨基酸：
  — 荧光检测：260nm 激发，310nm 发射
  — 流速：1ml/分钟
  — 柱箱温度：50℃
  — 梯度：在 40 分钟内由 0%B 到 50%B，在 10 分钟内由 50%B 到 90%B，在 2 分钟内由 90%B 到 0%B。

  按上述方法分离氨基酸如图 15.5 所示。

8）平衡 HPLC 柱约 15 分钟。

9）开始上述梯度，但不加样品。

10）当基线平稳后，注射进 100pmol 的 FMOC-Cl 衍生化的氨基酸标准品。

11）校正 HPLC 系统。

12）注射 50 μl 样品。

13）氨基酸分析后，计算氨基酸组成。

15.3.4 Dabsyl-Cl 柱前衍生化

材 料

— HPLC（见上文）
— C18 反相柱：Spherisorb ODS I，5μm 颗粒大小，250mm×4mm（Knauer，Berlin，德国）
— 加热块
— 两次重结晶的 dabsyl-Cl：在乙腈中新配制的浓度为 2nmol/μl
— 50mmol/L 的碳酸氢钠（pH8.1）
— HPLC 缓冲液 A：25mmol/L 的醋酸钠（pH6.5）
— HPLC 缓冲液 B：乙腈

衍生化过程

1）在衍生化之前，迅速用 50mmol/L 的碳酸氢钠（pH8.1）稀释冷冻干燥的样品到浓度 100pmol/10μl。

2）吸取 10μl dabsyl 溶液到 10μl 样品溶液中。

3）在 60℃进行衍生化反应 10 分钟。

HPLC 分离

4）用HPLC 分离衍生化的氨基酸，按下列条件进行：

— 流速：1ml/min
— UV/VIS 检测器：436nm
— 柱温：50℃
— 梯度：在 10 分钟内由 15%B 到 25%B，在 20 分钟内由 25%B 到 40%B，在 7 分钟内由 40%B 到 70%B。在 70%B 处保持 2 分钟，然后在 2 分钟内由 70%B 到 15%B

根据上述条件分离的氨基酸见图 15.6。

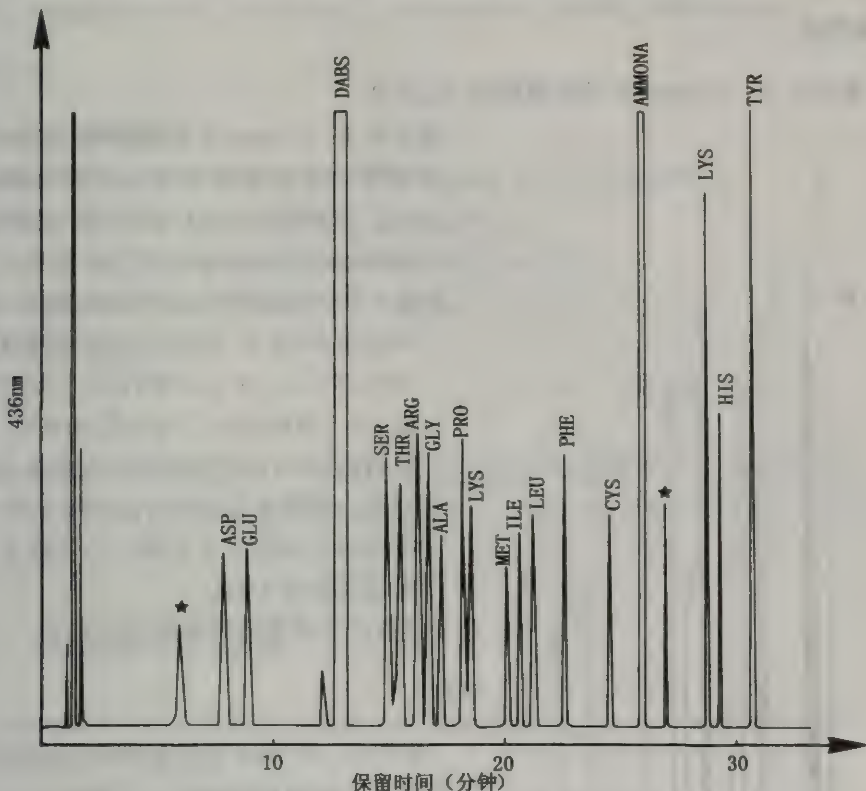


图 15.6　100pmol 氨基酸标准品混合物的分离结果，柱前用 dabsyl-Cl 衍生化（详见正文）。

5）开始梯度而不注射样品。
6）当基线稳定时，注射 100pmol 的衍生化的蛋白标准品，并再次开始梯度。
7）校正 HPLC 系统。
8）注射 10μl 的衍生化样品。
9）计算氨基酸组成。

15.3.5　OPA 柱后衍生化

HPLC 系统

柱后 OPA 氨基酸分析仪包括 2 个 HPLC 泵、一个动态混合室、一个荧光检测器、一

个带有温度控制单元的柱箱、一个自动加样器和一个带有两个泵以及两个反应器的试剂输送系统。用一个短的结合有钠离子或锂离子，能获得蛋白水解物或生理样品较好分辨率的 120mm × 4mm 的阳离子树脂交换柱（如 Eurokat，Knauer Scientific Instruments，Berlin，Germany）分离样品。用下列条件分离：

— 柱温：68℃

— 流速：0.4ml/分钟

— 荧光检测：345nm 激发，455nm 发射

HPLC 缓冲液

— 起始缓冲液 A：0.2mmol/L 的柠檬酸钠（pH3.0）-

— 缓冲液 B：0.2mmol/L 的硼酸钠（pH10.0）

— 用前将所有的缓冲液用超声波浴或连续使用，如即用 ERMA 抽气器（ERC，Alteglofsheim，Germany）抽气 15 分钟。

— 梯度：在 10 分钟内由 3%B 到 5%B，在 6 分钟内由 5%B 到 10%B，在 8 分钟内由 10%B 到 15%B，在 3 分钟内由 15%B 到 25%B，在 5 分钟内由 25%B 到 30%B，在 5 分钟内由 30%B 到 50%B，在 50%B 保持 5 分钟，然后在 5 分钟内由 50%B 到 80%B. 在 80%B 时保持 5 分钟，然后在 5 分钟内由 80%B 到 3%B。

按上述条件分离氨基酸见图 15.7。

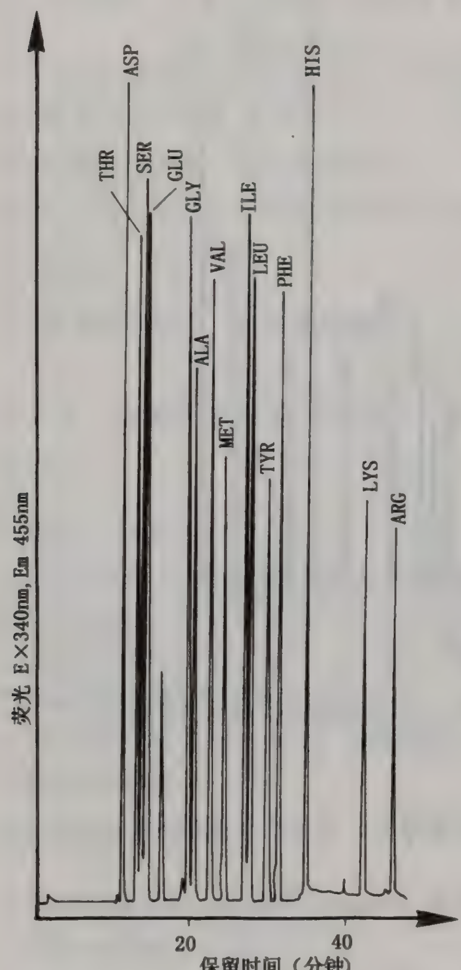


图 15.7　利用 OPA 和次氯酸盐试剂进行柱后衍生化后，50pmol 氨基酸标准品的分离结果（详见正文）。

试剂

分离后，用 OPA 将氨基酸进行在线衍生化。次氯酸盐只在脯氨酸或羟脯氨酸到达反应器时才供给。

— OPA 试剂：6mmol/L OPA /12mmol/L β-巯基丙酸（MPA）试剂。准备 1L 0.5mol/L 硼酸钾缓冲液（pH10.4）。

— 次氯酸盐试剂：加 400μl 次氯酸盐（如购自 Aldrich，5%游离氯化物）到 100ml 0.5mol/L 硼酸钾缓冲液中。

— 用超声波浴将两种试剂抽气 20 分钟

反应器

为了使所有的氨基酸用 OPA/MAP 衍生化，使用 6m 聚四氟乙烯管（直径为 0.25mm）。

为了使所有的次要氨基酸衍生化，使用 2m

聚四氟乙烯管（直径为 0.25mm）。

衍化过程

1）将 OPA 反应器在柱箱或水浴中 65℃加热。在流速 0.4ml/分钟下检测次要的氨基酸，用 0.2～0.1ml/分钟流速检测主要的氨基酸。

2）将次氯酸盐反应器在 65℃加热，并且只在脯氨酸洗脱时打开。流速为 0.1ml（可能为 0.1ml/min，译者注）。

注意：次氯酸盐破坏所有的主要的氨基酸。在主要的氨基酸到达反应器时，确保关闭输送泵。

校正和分析

1）开始梯度而不加样。

2）当基线稳定时，注入 100pmol 溶于 20μl 缓冲液 A 的氨基酸标准品。

3）用氨基酸标准品作为外部标准校正氨基酸分析仪。

4）加 50μl 缓冲液 A 到冻干的蛋白水解物中或生理样品中。

5）用分离氨基酸标准品同样的梯度分离样品。

6）计算氨基酸组成。

评　价

用次氯酸盐和荧光试剂 OPA 进行在线柱后衍生化消除了手工准备的步骤，而且，它提供了在低皮摩子时的最优再现率和灵敏度。这种分析仪通过改造可进行柱前衍生化和样品纯化。

15.4　氨基酸组成计算

1）用 100pmol 氨基酸标准品混合物校正氨基酸分析仪。氨基酸标准品分离后，每个峰的面积相当于 100pmol。

2）被分析样品中的不同氨基酸的量与氨基酸标准品混合物的量（如 100pmol）进行比较。

3）如果标准品混合物含有每种氨基酸各 100pmol，那么每一种氨基酸的量用以下公式进行计算：

$$\frac{\text{样品中氨基酸的面积}}{\text{标准品混合物中的氨基酸面积}} \times 100 = X(\text{pmol})$$

4）如果被分析的蛋白质的分子量未知，只可以确定被分析的样品的 Mol%。Mol%可按以下公式计算：

$$\frac{\text{被分析氨基酸的 pmol} \times \text{分子量}}{\text{发现的所有氨基酸重量总和(mol} \times \text{分子量)}} \times 100 = \text{Mol\%}$$

5）如果被分析的蛋白的分子量已知，则可按以下方法计算氨基酸组成：

每一种氨基酸的的重量经 Mol%与蛋白分子量相乘后确定。氨基酸残基数用氨基酸的分子量相除后决定。

蛋白量是以所有氨基酸的 pmol 量的总和除以所有的氨基酸残基数后得出。只有在分子量已知时才可能确定被分析蛋白的浓度。

15.5 氨基酸分析的优点

通过氨基酸分析可以确定以下内容：

- 单个氨基酸的摩尔百分比。
- 如果分子量已知，可知道氨基酸的组成（氨基酸残基数/mol）。
- 蛋白浓度，如 pmol。
- 蛋白纯度。当全部是氨基酸时，那么该样品是纯的，否则样品被污染了。
- 利用蛋白数据库进行均一性研究。

15.6 柱子的保养

1）使用与分离柱同样材料的预备柱子（2～4mm）相连的柱子。

2）在第一次使用前，用 80%甲醇水溶液去除所有的杂质，然后用缓冲液平衡 2 小时。用第二天将使用的缓冲液清洗过夜，在两小时内缓冲液 B 的梯度由 0%－80%B。保持流速在 0.5ml/分钟。

3）用无样品的空白梯度来检查柱子的纯度。

4）用氨基酸标准品测定柱效。

5）将样品溶液注射到样品缓冲液中进行 OPA 衍生化或注射 FMOC、dabsyl 衍生化的样品，或者进行 NBDCl 衍生化。

6）如果色谱图中出现“鬼峰”（“假峰”），那么就按以下方法进行柱子的再生：

— 用水洗柱获得稳定的基线
— 注射 4×200μl DMSO（二甲基亚砜）
— 用 100ml 水洗柱子
— 用甲醇替代水，冲洗柱子至获得稳定基线（约 100ml）
— 用氯仿替代甲醇，洗掉所有杂质
— 重复用甲醇洗柱（100ml）以获得稳定基线
— 用起始缓冲液平衡柱子
— 注射氨基酸标准品混和物检测柱子的分辨率

7）柱子用甲醇清洗后即可保存。

15.7 结果及讨论

利用 HPLC 进行氨基酸分析是一种快速且灵敏度高的方法。适宜的试剂选择依赖于应用的领域和问题的性质。两个参数是决定性的，即灵敏度和速度。尽管荧光试剂如 OPA 和 FMOC 在确定仲胺和色氨酸时有一定的局限性，但可以获得最高的灵敏度。dabsyl-Cl 能够确定所有的氨基酸，包括半胱氨酸和脯氨酸，但分析的灵敏度降低，柱子的

寿命也短。在研究实验室中，由于样品的量是有限的，而且重复分离新的样品需要花费数月的时间，所以高的灵敏度是很重要的，因此必须采用新的灵敏度高的方法。快速和自动化的方法对于临床应用和食品以及动物饲养工业方面是非常重要的。对于常规方法来说，实用性更重要。OPA 衍生化是最简单的技术，由于它需要很少的操作步骤，且全自动化。特异性、线性以及精确性对于常规方法来说也是很重要的标准。用 OPA 衍生化是最具特异性的方法。为此，所有其他试剂都可导致副产物的产生，而这些副产物会破坏感兴趣的氨基酸分离和鉴定。所有的反应条件都必须进行优化，以提供可靠的线性反应。精确度依赖于定量方法和滞留时间的稳定性。仔细校正仪器，选择综合参数以便正确鉴定色谱图中不同峰，这些都是非常重要的。一个衍生化反应的最高精确度只有在一个完全自动化的系统中才能获得。用次氯酸盐和荧光试剂 OPA 进行在线柱后衍生化消除了手工准备步骤，且提供了在低 pmol 浓度时的最优再现性和灵敏度。用次氯酸盐和 OPA 两步反应的结合使用能够确定主要氨基酸和次要氨基酸。HPLC 和柱后衍生化的结合提供了对于常规定量分析所必须的高再生率、高精确度、高速度以及高灵敏度。

尽管新的氨基酸分析方面的技术发展已经到了 fmol 水平，但是被分析样品中的污染物仍限制了高灵敏度的分析。在未来，研究减少样品背景的样品制备方法是非常重要的。只有纯的，无盐的样品才能保证 pmol 水平（否则分析的是杂质，而不是样品）的氨基酸分析的可靠性。

（张淑平 译　饶子和 校）

参考文献

Carisano A (1985) Rapid and sensitive method for the determination of proline by reversed -phase high-performance liquid chromatography with automated precolumn fluorescence derivatization. J Chrom 318: 132–138

Chang J.-Y, Knecht R, Braun DG (1983) Amino acid analysis in the picomole range by precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. Methods Enzymol 91: 41–49

Einarsson S, Josefsson B, Lagerkvist S (1983) Determination of amino acids with 9-fluorenylmethylchloroformate and reversed-phase HPLC. J Chromat 282: 609–618

Kamp RM, Vollenbroich D (1990) HPLC-Aminosäureanalytik mit Nachsäulenderivatisierung. BioTech. Nov. 38–41

Palmerini CA, Fini C, Floridi A, Morelli A, Vedovelli A (1985) HPLC analysis of free hydroxyproline and proline in blood plasma and of free and peptid bound hydroxyproline in urine. J Chromat 339: 285–292

Roth M (1972) Fluorescence reaction of amino acids. Anal Chem 43: 880–882

Spackmann DH, Stein W, Moore S (1958) Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal Chem 30: 1190–1206

第16章

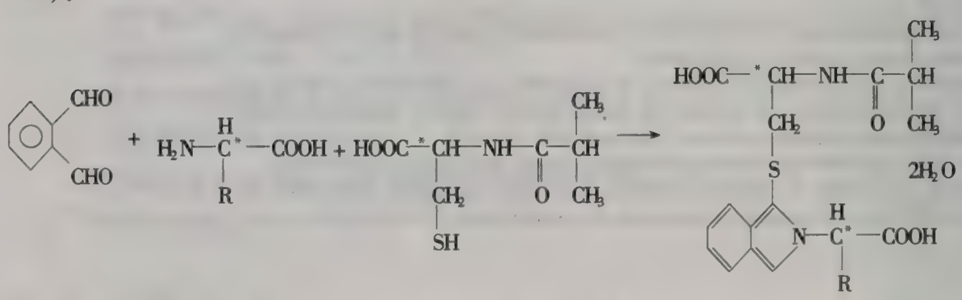
用 HPLC 进行 D-和 L-氨基酸定量分析

D. Vollenbroich, K. Krause

16.1 引　言

在蛋白质中，只有 L-氨基酸异构体的形式存在，但在大多数有机体中，D-氨基酸既作为多肽的结构元素，也以游离的形式存在。D-氨基酸的酶合成广泛分布在微生物中，在细菌细胞壁的装配或次生代谢物，如抗生素等的生物合成中出现。从这些来源中，D-氨基酸进入了动物、植物、食物以及饮料中。因此，D-氨基酸浓度的确定在多肽的研究、药物以及食物技术领域也是有用的。

为了分离 L-氨基酸，柱前衍生化与高效液相色谱（HPLC）相结合是最常用的方法之一。这种方法也可以用于 D-氨基酸和 L-氨基酸的分离和定量。所有主要的 D-氨基酸和 L-氨基酸的衍生化都可以用 OPA 和硫醇来进行（Roth 1972），通过荧光检测将灵敏度提高到 fmol 水平。这种衍生化技术很容易进行，而且还具有时间短、衍生化产率高的优点（详见第 15 章）。为了获得光学异构体的高色谱分辨率，非对称环境的引入是必须的（Manning and Moore 1968；Hare and Gil-Av 1979）。可以通过利用 OPA 和 N-异丁酰-L-半胱氨酸或 N-异丁酰-D-半胱氨酸作为硫醇，形成一个荧光双肽异吲哚，将每种氨基酸进行分子内转换形成非对映异构体来达到（dipeptidic isoindole）（Brückner 1991）：



OPA　　　　氨基酸　　　　　　N-异丁酰-L-半胱氨酸

这里介绍一种快速而易行的反相 HPLC 方法，只需一步高分辨率的色谱分析且检测极限是在 pmol 水平，就几乎可将所有的蛋白质 L-氨基酸从它们的 D-异构体中分离出来（Brückner 1991，1992）。这种方法可进行全自动分析，获得比手工操作更高的再现率。其缺点是次要氨基酸脯氨酸和羟脯氨酸不能直接被 OPA 衍生化。因此，为了分析

这些次要的氨基酸，在衍生化之前有必要进行额外的氧化步骤并单独运行一次分离色谱以分析这些次要氨基酸。OPA/异丁基-半胱氨酸系统也不适于半胱氨酸的确定，因产生低荧光强度的干扰峰（Brükner 1991）。为了克服这个问题，使用了手性静止相（chiral stationary phase）（Merino 1990）、手性洗脱（chiral elution）（Hare and Gil-Av，1979）或其他非对映体双肽等方法（Manning and Moore 1986）。对此，Lindner（1988）曾进行了概述。

16.2 材　　料

仪　器

— HPLC 梯度系统包括：荧光检测器、整合器（integrator）、柱子加热器以及抽气器。
— 可选：具有衍生化功能的自动加样器。
— HPLC 柱，反相 C_{18}，250mm×4.6mm，直径 4μm，60Å，如 Nova-Pak（Waters，Milford，MA，USA）
— 可选：保护柱，反相 C_{18}，10mm×3.9mm，直径 4μm，60Å，如 Nava-Pak（Waters，Milford，MA，USA）
— OPA/异丁基-L-半胱氨酸手性衍生化试剂（如 Pierce，Rockford，IL，USA；或 GROM，Herrenberg，Germany）。异丁基-L-半胱氨酸试剂的准备过程由 Brückner 说明（1991）
— D-，L-氨基酸标准品（如 Sigma，Deisenhofen，Germany；或 GROM，Herrenberg，Germany）
— 内部标准品，如 L-高精氨酸（ICN，Meckenheim，Germany），或 L-正缬氨酸（Sigma，Deisenhofen，Germany）

缓冲液

— 衍生化缓冲液：1mol/L 的硼酸缓冲液（pH10.7）：称 61.8g 硼酸，稀释到近 800ml 的去离子水中，用 KOH 调节 pH 值后，用去离子水定容到 1L。检测极限主要受衍生化缓冲液的硼酸质量的影响。高灵敏度的分析要使用超纯级的硼酸，如 Suprapur（Merk，Darmstadt，Germany）。这种缓冲液应放置在室温以防结晶。
— OPA 试剂：在使用前用衍生化的缓冲液直接稀释 OPA/N-异丁酰-L-半胱氨酸衍生化试剂到终浓度 260mmol/L 的 N-异丁酰-L-半胱氨酸和 170mmol/L 的 OPA，或根据厂家说明书进行。将 OPA 试剂放置在 -20℃至多 2 天，最好现用现配。
— 洗脱剂 A：23mmol/L 的醋酸钠缓冲液（pH6.0）：称 1.88g 醋酸钠，溶解于约 800ml 的去离子水中，用醋酸调节 pH 值，最后用去离子水定容到 1L。
— 洗脱剂 B：600ml 甲醇与 50ml 乙腈混合。
— 洗脱剂应过滤（0.45μm 滤膜），并用水泵、超声波或自动化的抽气器，如 ERMA（Japan，Alteglofsheim，德国）进行抽气。乙腈是一种致癌剂，避免吸入或与皮肤接触。在洗脱剂准备过程中，使用一个排烟罩，并将装洗脱剂的瓶及废液瓶拧紧。由于使用这种有毒物质而产生的废弃物应适当处理。

16.3 试验步骤

样品准备

氨基酸必须以游离态存在，这种氨基酸可通过乙醇抽提及蛋白和多肽完全水解后获得。为了保持峰面积与浓度的比例在线性范围内，样品中每种氨基酸的总量不能超过5nmol。样品应该无盐。

1）将反应管加上样品溶液。
2）去除真空器中的溶剂。
3）用0.1mol/L HCl稀释样品到近200pmol/μl。
4）氨基酸标准品溶液应含有甘氨酸和D-和L-氨基酸及L-正缬氨酸或L-高精氨酸作为内部标准品，在0.1mol/L HCl中其浓度为200pmol/μl。

衍生化

1）将25μl的氨基酸溶液转移到新反应管中。
2）按1∶1的比例混合溶液和OPA试剂。关闭反应管，小心旋涡振荡，并将混合物在25℃保温90秒。
3）衍生化后立即注射10μl样品到HPLC系统。OPA衍生物只稳定约2分钟。作为自动加样器的一部分的衍生化设备，如购自Spark Holland的Promis II用于加样可以改进再现率。这类全自动化的系统将样品和衍生化试剂在样品环及注射针中混合，一定程控反应时间后注入HPLC系统。

色谱过程及评价

1）洗脱流速：1ml/min。
2）荧光检测器：300nm激发，445nm发射。
3）以线性梯度分离氨基酸，在75分钟内，由0%洗脱剂B到53.5%洗脱剂B。用100%洗脱剂B洗柱子10分钟，再用100%洗脱剂A平衡5分钟。
4）柱温保持在30℃。
5）氨基酸的浓度计算是根据样品中氨基酸峰面积和相应的同样条件下分离的氨基酸标准品相比较或与内部标准相关（在第15章中提供了较为详细的描述）。荧光信号强度依赖于异构体形式。在这种方法中，从L-氨基酸获得的非对映异构体与D-异构体相比，通常表现出荧光信号降低。因此，异构体的比例应该用荧光因子F定量：

$$F = \frac{\text{D-氨基酸的峰面积}}{\text{L-氨基酸的峰面积}}$$

6）荧光因子F的计算是根据以外消旋氨基酸混合物的荧光信号作为几次测量的平均值来计算。
7）在计算对映体比例之前，用相应的荧光因子F乘以所有从L-氨基酸接受到的荧光信号。如果能从积分氨基酸标准品色谱图中所获得的浓度值计算这个比例，那么就没必要做此计算。

16.4 结果及评论

图 16.1 是用 OPA/手性硫醇技术衍生化，将几种所有来自蛋白质的 L-氨基酸从相应的 D-氨基酸对映体及非手性甘氨酸完全分离的洗脱图。所有的非对映体氨基酸衍生物几乎是由简单的线性梯度来决定基线的。生理氨基酸的对映体可以以同样的方法分离。100pmol 的异吲哚衍生物可用高精度的荧光信号峰面积积分进行常规定量。全自动化系统的再现率超过 99.8%。这些事实表明这种方法适于大范围的 L-和 D-游离氨基酸的检测和定量。图 16.2 所示为一个实例，是对微生物合成的脂肽抗生素进行的氨基酸组成分析。从标准色谱图计算得到的荧光因子 F（图 16.1）表明来自于 L-和 D-对映体的荧光信号的不等性。因此，这些因子对于样品中氨基酸的组成计算的校正是很必要的，如样品枯草菌表面活性剂的肽部分的氨基酸组成。

氨基酸	Asp	Glu	Ser	His	Ala	Arg	Tyr	Val	Met	Phe	Leu	Ile	Lys
荧光因子(F)	0.950	1.117	1.078	1.070	1.117	1.140	1.116	0.896	1.234	0.881	0.905	0.955	1.085

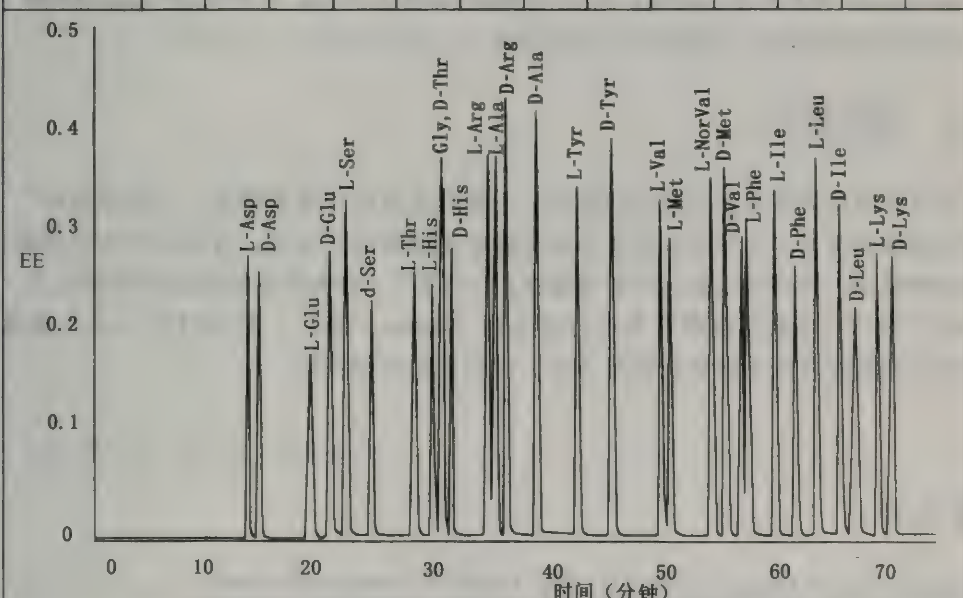
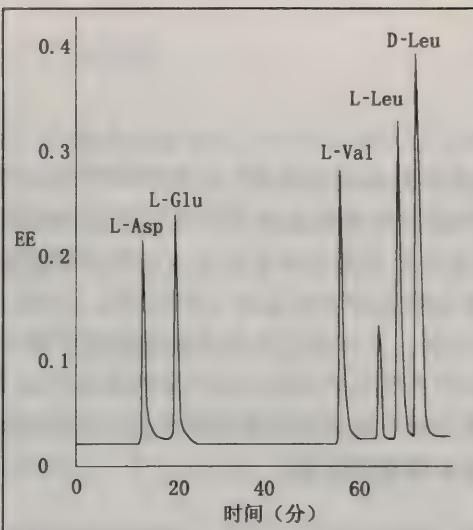
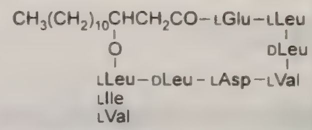


图 16.1 用 OPA 和 N-异丁酰-L-半胱氨酸衍生化后 L-氨基酸和 D-氨基酸标准品分离结果。注射了 14 对氨基酸对映体（10μl 中各含每种 L-和 D-氨基酸 1nmol）。氨基酸以线性梯度洗脱，缓冲液为甲醇/乙腈（600ml + 50ml）的醋酸钠缓冲液（23mmol/L，pH6.0），在 75 分钟内由 0% 到 53.5%的甲醇/乙腈。内部标准品是正缬氨酸（1nmol）。





氨基酸	预期的比例	测量的比例
L-Asp	1	0.84
L-Glu	1	0.93
L-Leu	1.6-1.8	1.68
D-Leu	,2	2.13
L-Val	1.0-1.2	1.12
L-Ile	0.1-0.3	0.30

图 16.2 来自于枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）的枯草菌表面活性剂，一种脂类七肽（lipoheptapeptide）抗生素的分离结果。所有的分离条件如图 16.1 所述。注射了大约 1nmol 的水解的枯草菌表面活性剂。对映体的比例是根据图 16.1 所示的荧光因子 F 计算的。

16.5 疑难解析

温度对峰的分辨率具有明显的影响。一般的规则是"温度越高，分辨率越高"，这也适用此种情况下。要知道如果在色谱过程中使用较高的温度，可能会发生外消旋化。在某些情况下，具有可以逆转每种氨基酸的 D-和 L-对映体对的洗脱顺序的优点。用 OPA/异丁酰-D-半胱氨酸很容易进行衍生化（Brükner 1991）。加 0.01%（w/v）叠氮化钠或可买到的保存缓冲液到洗脱液 A 中，以防止微生物污染。

（杨 傲 译 饶子和 校）

参 考 文 献

Brückner H, Jaek P, Langer M, Godel H (1992) Liquid chromatographic determination of D-amino acids in cheese and cow milk. Implication of starter cultures, amino acid racemases, and rumen microorganisms on formation, and nutritional considerations. Amino Acids 2: 271–284

Brückner H, Wittner R, Godel H (1991) Fully automated high-performance liquid chromatograpic separation of DL-amino acids derivatized with *o*-phthaldialdehyde together with *N*-isobutyryl-cysteine. Application to food samples. Chromatographia 32: 383–388

Hare PE, Gil-Av E (1979) Separation of D and L amino acids by liquid chromatography: Use of chiral eluants. Science 204: 1226–1228

Lindner W (1988) Indirect separation of enantiomers by liquid chromatography. In: Zief M, Crane LJ (eds) Chromatographic chiral separations. Dekker, New York, pp 91–130

Manning JM, Moore S (1968) Determination of D- and L-amino acids by ion exchange chromatography as L-D and L-L dipeptides. J Biol Chem 243:

5591–5597
Merino IM, Gonzalez EB, Sanz-Medel A (1990) Liquid chromatographic enantiomeric resolution of amino acids with β-cyclodextrin bonded phases and derivatization with *o*-phthalaldehyde. Anal Chim Acta 234: 127–131
Roth M (1972) Fluorescence reaction for amino acids. Anal Chem 43: 880–882

第六部分
蛋白质中的半胱氨酸残基和脂类的鉴别

第 17 章

蛋白质中半胱氨酸残基与二硫键的鉴别

T. A. Egorov

17.1 引　言

半胱氨酸残基的巯基是所有蛋白质氨基酸残基中最活泼的基团，参与加成、取代、烷化、氧化反应和巯基-二硫键交换等反应。巯基可以迅速与重金属反应，在光照下分解。在诸如半胱氨酸类酶中，巯基对蛋白质的生物活性起重要作用。在铁盐或其他温和氧化剂存在下，这种特别活泼的基团十分容易被空气中的 O_2 氧化为二硫键。氧化产物是胱氨酸，在胱氨酸中二硫键在两个半胱氨酸残基间形成一个共价桥。二硫键可以被还原剂分开，例如巯基乙醇或二硫苏糖醇，分开二硫键后由胱氨酸产生两个半胱氨酸分子。

在这里，简单介绍一下两个鉴定蛋白质中半胱氨酸残基和二硫键的方法。这些选择性分离方法的优点是：

- 由于方法具有选择性，含有半胱氨酸的多肽可以从大而复杂的蛋白质中有效地分离与鉴定出来。
- 即使是疏水蛋白质分子，如膜蛋白，也可以很容易用酶降解。

17.2 原理与应用

17.2.1 共价层析法鉴别蛋白质中的半胱氨酸残基

人们提出了一些鉴别蛋白质中半胱氨酸残基的方法，这些方法是基于对这些氨基酸残基做选择性标记。但是，这些方法中没有十分有效的，特别是对较大的蛋白和（或）膜蛋白。Egorov 等人在 1975 年提出用共价层析法分离含半胱氨酸多肽的选择性方法。这个方法的原理是蛋白质中自由的巯基通过巯基-二硫键交换反应与不溶性的支持物（thiopropyl Sepharose 6B，图 17.1）共价结合，然后用酶降解固定化的蛋白（图 17.2）。如果蛋白分子中有几个半胱氨酸残基，则将有多位点结合。含有半胱氨酸的多肽将结合到支持物上，酶解后，不含半胱氨酸的多肽（组分 1）通过漂洗可以除去，而含半胱氨酸的多肽则可以通过还原反应从支持物上分离出来（组分 2）。所得到的组分 2 含有：含半胱氨酸的多肽、过量的还原剂和 2-巯基吡啶（2-thiopyridone）。组分 2 和盐分可以经过脱盐和（或）反相 HPLC 分离。**注意**：在这一步，较小的亲水多肽可能会丢失。由

于过量的巯基吡啶可以抑制巯基的烷化，所以只有在脱盐步骤后含半胱氨酸的多肽才可以被烷基化。在 210～214nm 与 254nm 两个波长监测 S-乙基吡啶化的多肽可以帮助进一步检测这些肽。下面描述的操作程序是对上述方法的进一步修正，它适合于微克级的蛋白样品分析。

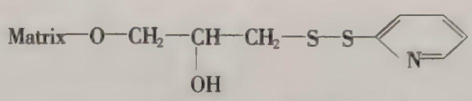


图 17.1 Thiopropyl Sepharose 6B 分子的部分结构。该试剂是一个含 2-巯基吡啶基保护基团混合的二硫化物，这保护基团通过化学稳定的醚键连接到琼脂糖（sepharose）上。在不损坏基质的条件下，不会发生泄漏。分子中的 2-羟基丙基残基为亲水隔离基团。每毫升 thiopropyl Sepharose 6B 胶中约含有 20μmol 2-吡啶二硫化物基团。不同蛋白分子的偶联结合能力不同。血浆铜蓝蛋白（MW132 000）的典型值是 14mg/ml 胶。商品化的 thiopropyl Sepharose 6B 是以冻干粉状态出售的（1g 冻干粉溶胀后体积约为 3ml）。加上添加剂可保护膨胀的特性。

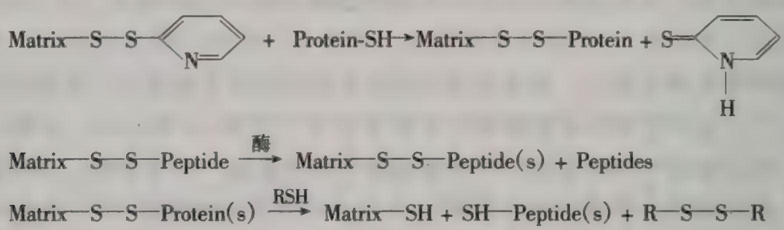


图 17.2 含巯基蛋白在活化的 thiopropyl Sepharose 6B 上的共价层析和含半胱氨酸多肽选择性分离的反应过程。

17.2.2 二硫键的鉴定

在蛋白质中，与二硫键连接相关的半胱氨酸残基的数量可以通过对其还原和烷基化反应前后的质量分析来确定（Egorov 等人于 1994 年提出）。首先分开完整蛋白的胱氨酸残基（在 S-S-之间），然后根据氨基酸组成、顺序、质量确定含二硫键的多肽，就可以确定蛋白质中二硫键的位置（更广泛的参考资料和确定蛋白质中二硫键的其他方法请参看 Gray 1993）。二硫键的分析涉及到下面几步：

- 完整蛋白分子的烷基化（以防有自由的巯基）
- 化学法或酶解法分解蛋白分子
- 在 pH＝2 的条件下，用反相 HPLC 分离分解产物
- 多肽组分的还原与烷基化反应以及产物分离
- 烷基化多肽的序列测定和（或）氨基酸组成分析
- 二硫键连接片段的计算机或人工排序

17.3 含半胱氨酸肽的分离

下述方案适合于 1mg 蛋白样品。步骤主要有：

一 样品的准备

— 固定
— 结合物的酶解
— 肽（Cys^-）的分离
— 肽（Cys^+）的分离
— 肽（Cys^+）的烷基化
— 多肽的反相 HPLC

17.3.1 材 料

试 剂

— thiopropyl Sepharose 6B：大约 45ml 溶胀的凝胶（Pharmacia，Uppsala，Sweden）或约 15ml（Sigma，St. Louis，USA）
— aldrithiol-2（2，2′-二吡啶基二硫化物，DPDS；2，2′-二巯基吡啶；Aldrich，Milwaukee，USA）
— 4-乙烯基吡啶（Aldrich Milwaukee，USA）
— 胰蛋白酶（Promega，Madison，USA）
— 盐酸胍（ultra grade；Sigma，St. Louis，USA）
— Tris 碱（TRIZMA，ultra grade，Sigma，St. louis，USA）

缓冲液

— 缓冲液 A（偶联/烷基化缓冲液）：0.5mol/L Tris 溶于 6mol/L 盐酸胍和 1mmol/L EDTA（pH7.6）中
— 缓冲液 B（胰蛋白酶及其他相关酶的消化缓冲液）：0.1mol/L Tris（pH7.6）
— 缓冲液 C（漂洗缓冲液）：缓冲液 B 溶于 0.5mol/L NaCl 中
— 缓冲液 D（还原缓冲液）：缓冲液 B 溶于 0.5mol/L NaCl 和 0.1mol/L DTT 中
— 缓冲液 E（保存缓冲液）：0.1mol/L 醋酸钠（pH5.5），含 0.1%叠氮化钠

HPLC 溶剂

— 溶剂 A：0.1%三氟乙酸（TFA）
— 溶剂 B：0.08% TFA 溶在乙腈中

17.3.2 方法

样品准备

1）固定前蛋白分子的还原反应（仅对含有二硫键的蛋白）：蛋白溶解于 300μl 缓冲液 A 中。加入 10μl DTT 溶液（1.4（mol/μl），37℃，反应 4 小时或室温过夜。
2）用“短”的乙腈梯度（即洗脱盐分之后，在 15 分钟内从 10% B 到 60% B）用反相 HPLC 进行蛋白脱盐（适用于任何样品）。在 214nm、254nm 或 280nm 检测蛋白组分，然后用真空离心蒸发浓缩器干燥。

枪头（小）柱子（tip column）

1）准备枪头（tip）柱子：从 1ml Gilson 型枪头切下 1mm，插入小片玻璃/羊毛棉用作过滤器。
2）连一个 2 ~ 5ml 带聚乙烯或聚四氟乙烯管的塑料注射器（大约 1mm 内径，100mm 长）到柱子上，用聚硅氧烷或聚乙烯管作接口。
3）以 100μl 为单位给柱子标刻度。

Thiopropyl-Sepharose 6B 的准备

1）称 150mg thiopropyl Sepharose 6B 凝胶干粉放入到含 4 ~ 5ml 水的烧杯或烧瓶里，轻轻搅拌后放置 15 分钟（偶然搅拌），倒出上清液。
2）加入 1ml 水，轻轻混合，用吸液器把悬浮物转移到小层析柱。用注射器除去过量的液体，但不要吸干，同时要避免在胶内产生气泡，如有气泡则要重新悬浮凝胶。将剩余的凝胶转入柱子，除去过量液体.
3）用 3 × 500μl 缓冲液 A 平衡层析柱。用注射器除去过量缓冲液，避免气泡。

固　定

1）用 1ml 注射器替换小柱子注射器。
2）固定前，用 300μl 缓冲液 A 溶解干的蛋白样品。将蛋白样品加入层析柱，小心推拉注射器活塞，混合至约 500μl，避免产生气泡。
3）每 20 分钟混合一次，持续 4 小时。混合的操作方法同步骤 2 。
4）用注射器除去液体。用 3 × 100μl 的缓冲液 A 洗涤凝胶。如需要进一步分析，收集被结合的冲洗物，该组分含有非结合蛋白。
5）用 5 × 200μl 的缓冲液 A 再次洗涤凝胶，丢弃洗脱物。

结合物的酶解

1）用 5 × 200μl 的缓冲液 B 平衡结合物，除去过量的缓冲液。
2）加入 200μl 酶液，用注射器混合胶。
3）用封口膜紧紧地密封柱子，把柱子放入温度自动调温器里，37℃放置 1 ~ 4 小时。
4）用注射器除去液体，用 3 × 200μl 缓冲液 C 冲洗胶。如果需要进一步的分析，应该收集结合的组分（组分 1，不含半胱氨酸的多肽）。
5）用 2 ~ 5ml 注射器替换 1ml 注射器，用 5 × 300ml 缓冲液 C 再冲洗胶，丢弃洗脱物。
6）用 1ml 注射器替换掉 2 ~ 5ml 注射器，加入 900μl 缓冲液 D。用注射器除去约 50μl 液体，放置 30 分钟。
7）从柱子慢慢除去液体，收集该组分（组分 2，含半胱氨酸的多肽）。
8）用 5 × 300μl 的缓冲液 C 冲洗胶，丢弃洗脱液。

Thiopropyl Sepharose 6B 的再生

1）把 2mg 的 2，2′-二吡啶硫化物（DPDS）溶于 2ml 乙醇中，用 3ml 缓冲液 B 稀释。

2）用6×0.5ml的DPDS再生胶。

3）用含0.1%叠氮化钠的10×0.5ml的缓冲液B冲洗胶。用该缓冲液充满柱体。

4）用封口膜密封柱子，放置4℃保存（最多1个月）。

含半胱氨酸的肽的反相HPLC

1）对于较长的多肽（>15~20个残基），用0%B或5%~10%B平衡分析反相柱，流速在1ml/min，温度为40℃~50℃；在210~214 nm监测。

2）把组分2注入柱子，用0%B冲洗柱子，直到所有盐分被洗净。

3）开始走梯度，如在60分钟内从0%B到40%B，流速为1ml/min，收集组分。

4）在真空离心蒸发浓缩器上蒸干组分蛋白。

含半胱氨酸肽的烷基化反应

1）把多肽溶于40μl缓冲液A中，

2）加入1μl DTT（1.4μmol/μl），放置在氮气中反应10分钟。

3）加入2μl按1∶10用乙醇（约2μmol）稀释的4-乙烯基吡啶，放置反应10分钟。

4）脱盐和/或（如前所述）用反相HPLC迅速分离被烷基化的肽，在210 nm~214nm和254 nm监测肽。

17.4 蛋白质中二硫键的鉴别

此方案适合于约100μg的蛋白质。

17.4.1 材料

试剂

— 溴化氰（CNBr）：5mol/L CNBr乙腈溶液（Aldrich Milwaukee，USA）或固体CNBr（Sigma，St. Louis，USA）

— 胰蛋白酶（Promega，Madison，USA）

— 4-乙烯基吡啶（Aldrich Milwaukee，USA）

— 二硫苏糖醇（DTT）（Sigma，St. Louis，USA）

— Tris（TRIZMA base；Sigma，St. louis，USA）

— 盐酸胍（Sigma，St. Louis，USA）

— 三氟乙酸（TFA）：HPLC级

— 乙腈：HPLC级

缓冲液与溶剂

缓冲液A（消化缓冲液）：0.1mol/L Tris（pH7.6）

缓冲液B（烷基化缓冲液）：0.1mol/L Tris溶于5mol/L盐酸胍和1mmol/L EDTA，pH7.6

溶剂 A：0.1%TFA 水溶液

溶剂 B：0.08%TFA 的乙腈溶液

溴化氰裂解

1）将蛋白样品溶于 100μl 70%TFA 中。

2）加入 1mg CNBr 或 2μl 5mol/L CNBr 的乙腈溶液，用氮/氩净化，放置于黑暗中，室温下反应 18 小时。

3）在真空离心蒸发浓缩器上，蒸干反应混合物。

4）产物溶于 50μl 缓冲液 B 中，注入分析柱。

5）用乙腈梯度通过反相 HPLC 分离：在 60 分钟内从 5% B 升至 40%B，流速 1ml/min，温度 40℃，在 210～214nm 检测肽吸光度，0.1～0.2 的感度，在真空离心蒸发浓缩器上蒸发收集到的组分；

6）把每个组分溶于 40μl 缓冲液 B 中，加 1μl（1.4μmol/μl）DTT，37℃反应 30 分钟。

7）加 2μl 乙醇（约 2μmol）1：10 稀释的 4-乙烯基吡啶，置黑暗中反应 10 分钟，通过向反相柱中注入或加 1ml DTT（如第 6 步中）终止反应。

8）洗出过量的试剂和副产物后，用与第 5 步完全相同的梯度通过反相 HPLC 分离被烷基化的肽。

9）把收集到的组分分成相等两部分，在真空离心蒸发浓缩器上蒸发。

10）取其中一部分烷基化的组分用于氨基酸和/或氨基酸序列分析。

11）通过计算机检测或人工排序，找出用二硫键连接起来的片段。

12）当一个片段（S-S-核心）上有两个或更多二硫键时，用下面所描述的方法用胰蛋白酶降解二硫键连接片段。

13）把 S-S-核心溶于 50μl 缓冲液 A 中，加 1μg 胰蛋白酶，在 37℃酶解 4 小时。

14）用乙腈梯度，即从 0%B 到 40%B，流速 1ml/分钟，温度 40℃，反相 HPLC 分离降解混合物。

15）收集组分，进行 6～12 步。

17.5 评价与疑难解析

- 用 thiopropyl Sepharose 6B 填充小 tip 柱，操作起来需要一些经验，实验前实践一下会有帮助。
- 如果蛋白不含二硫键，就不经过还原步骤。
- 如果蛋白已经用其他方法纯化过，优先推荐用反相 HPLC 方法对任何蛋白样品进行脱盐。
- 被还原和脱盐处理过的蛋白样品要储存在超低温的冰箱中（－70℃）。
- thiopropyl Sepharose 6B 在用后可以被再生重复使用 2～3 次。
- 由于含有二硫键的完整蛋白不能被充分酶解，为了分离二硫键连接的片段，推荐用化学方法（比如用 CNBr 裂解）裂解。胰蛋白酶、糜蛋白酶、Lyc-C、Arg-C 和 Glu-C 等酶可以用来作二硫键连接片段的二级酶解。

• 对用于两种方案来说，必须用不含巯基（如巯基乙醇，DTT 或半胱氨酸）、氧化剂或重金属的缓冲系统（除非必要时）。优质试剂和去离子水是必需的。

（冯　亮 译　饶子和 校）

参考文献

Egorov TA, Svenson A, Ryden L, Carlsson J (1975) Rapid and specific metod for isolation of thiol-containing peptides by thiol-disulfide exchange on a solid support. Proc Nat Acad Sci USA 72: 3029–3033

Egorov TA (1991) Use of Thiopropyl-Sepharose 6B for isolation and structure-functional analysis of thiol proteins. In: Jornvall H, Hoog J-O, Gustavsson A-M (eds) Methods in protein sequence analysis, Birkhausen, Basel, pp 177–185

Egorov TA, Musolyamov AKh, Andersen J, Roepstorff P (1994) The complete amino acid sequence and disulfide bond arrangement of oat alcohol-soluble avenin-3. Eur J Biochem 224: 631–638

Gray WR (1993) Disulfide structures of highly bridged peptides: a new strategy for analysis. Protein Science 2: 1732–1748

第18章

蛋白的脂类修饰

T.G. Giannakouros

18.1 引 言

在过去的约12年中，在真核细胞中一组由不同脂类分子进行的蛋白质的翻译后修饰已被鉴定出来（有关综述见 Schmidt 1989，McIlhinney 1990，Gordon et al. 1991，Magee 1991）。在许多情况下，这种脂类修饰显示出了对携带这些脂类的蛋白质亚细胞定位的必要性。现在已知有许多胞内蛋白就携带此目的的脂肪酸修饰。已从原癌基因产物 $PP60^{src}$ 得到例证：14碳饱和脂肪酸豆蔻酸（C14：0）是通过酰胺键与一系列蛋白质N端连接的。定点诱变的实验证明：蛋白的酰化作用是其膜定位和转化活性（transforming activity）所必需的。豆蔻酰化酶已经被分离出来，并发现它对酰基链长度具有高度专一性。影响酰化路径的抑制剂提供了一条癌症和包括HIV在内的病毒感染的专一性化疗的充满吸引力的方法。

长链脂肪酸，尤其是棕榈酸（C16：0），能连接到蛋白上，通常是通过硫酯键与半胱氨酸连接，或者是通过氧酯键与丝氨酸或苏氨酸连接。棕榈酸化可发生在跨膜蛋白和胞内蛋白上。在前一种情况，酰化位点常常是在胞质序列内或者是在跨膜区本身。ras蛋白的棕榈酰化需要紧密的膜结合与聚异戊二烯化（见下述）协同作用来确定蛋白特异的亚细胞定位。

蛋白的聚异戊二烯化已经在最近几年得到确证，这往往是通过15碳（farnesyl）或20碳（geranylgeranyl）甾体前体将半胱氨酸烷基化而实现的（最新综述见 Magee and Newman 1992；Schafer and Rine 1992；Sinensky and Lutz 1992）。ras蛋白的法呢基化（farnesylation）与上游附近的棕榈酸残基或一个多碱基序列协同指定胞质膜结合。这些修饰发生在一般模式为CAAX（C，半胱氨酸；A，脂肪基；X，其他任一氨基酸）的羧基端部分。在X位置的小而亲水的侧链倾向于半胱氨酸残基的法呢基化，而大的脂肪基则倾向于香叶基香叶酯化（geranylgeranylation）。除了聚异戊二烯以外，这些序列往往经过裂解除去AAX序列，或经过α-羧基组的羧甲基化进行修饰。在ras相关蛋白家族rab蛋白中发现，蛋白的香叶基香叶酯化也能被另外在蛋白末端的两个单元：半胱氨酸－半胱氨酸或半胱氨酸-X-半胱氨酸（X，其他任一氨基酸）启动。这些脂类修饰的细微变化和蛋白序列很可能导致了这一家族不同成员对膜内系统部分的高度选择性。

18.2 方　法

18.2.1　蛋白酰基化的检测

在少数情况下，酰基化已经从非标记的纯化蛋白的结构分析中得到认识。然而蛋白的脂肪酸修饰一般是用特定的脂肪酸对适当培养的细胞株或原代细胞进行代谢标记后来检测。（Magee and Courtneidge 1985; Magee et al. 1987）由于细胞倾向于通过β-氧化延长或缩短碳链，进而实现脂肪酸的互变，所以并入的标记物的特点必须要确定。与酰胺和硫酯相连的脂肪酸可通过简单的化学裂解来区分。

用脂肪酸对组织培养细胞代谢标记

步　骤

1）在组织培养皿中生长细胞至70%～90%的融合度。也可以从新宰杀的动物中迅速取组织，用无血清的组织培养基清洗，然后用小剪子和解剖刀切成约1mm长的小块，最后将这些小块组织转移到含全组织培养基的培养皿中。
2）用热的脂肪酸培养基（FA）取代原培养基培养1小时。脂肪酸培养基（FA）的组成如下：
— Dulbecco's 改良的 Eagle's 培养基（DMEM）或适当的其他培养基（根据细胞类型）
— 5%血清（新生或胎儿牛血清）
— 4倍正常浓度的非必需氨基酸
— 5mmol/L 的丙酮酸钠
3）加［9，10—^{3}H］脂肪酸乙醇溶液到培养基中，浓度为50～200μCi/ml（轻轻倾斜培养皿，将标记物加到底部以免乙醇抽干细胞），轻轻振摇以分散标记物。
4）放置适当的时间（6小时至过夜）。
5）用冷的磷酸盐缓冲液（PBS）冲洗细胞，然后在含有二硫苏糖醇的凝胶上样缓冲液或免疫沉淀缓冲液（RIPA）中直接裂解细胞。免疫沉淀缓冲液（RIPA）的组成：20 mmol/L Tris，150mmol/L NaCl，1mmol EDTA，0.5%（v/v）NP40，0.5%（w/v）脱氧胆酸钠，0.1%（w/v）SDS，1%抑蛋白酶肽（aprotinin）（Sigma，St. Louis，USA），0.2mmol/L 苯甲荃磺酰氟（PMSF），pH7.4。
6）直接将裂解物上样或经适宜的抗体进行免疫沉淀后的样品上样到SDS－聚丙烯酰胺凝胶上。使染料的前缘跑出凝胶以除去游离的标记物及磷脂。将胶晾干，然后用2，5-二苯基唑（PPO）处理后进行荧光色谱。PPO比其他的水溶性的荧光剂（如水杨酸等）更有效。

评价及注释

- 在标记的培养基中使用较低浓度的血清（1%～5%）和含有5mmol/L丙酮酸钠以及提高氨基酸的浓度，均有利于使带标记的脂肪酸的掺入的提高，否则，标记物的重新掺入率显著降低。

- 在体内标记中，9，10-氚标记的脂肪酸是高效专化活性和可检测性的最佳组合。由于氚远离易于发生β-氧化的羧基端，因此，氚的重并入被减少。由于上述原因，^{14}C标记的脂肪酸，特别是标记在1位置上的脂肪酸，应避免用于体内的研究，但可用于体外酰基化的研究。
- 脂肪酸常常是生产厂家以甲苯溶液的储存形式提供。在使用前应在通风橱中用氮气将甲苯除掉。这些脂肪酸重新溶解在乙醇中至10~50mCi/ml的浓度。在这种情况下，它们能在-20℃下储存数月以至数年。
- 由于硫酯键连接的酰基十分活泼，甚至可被还原而被除去，故凝胶上样缓冲液中的二硫苏糖醇的浓度不要超过20mmol/L。

酰基化蛋白的脂肪酸连接分析

硫酯、氧酯、酰胺之间可用选择性试剂通过化学裂解来区分。这可简便地通过[^3H]脂肪酸标记蛋白的SDS-PAGE电泳（聚丙烯酰胺凝胶电泳）重复胶条来进行。这个方法稍作修改则可用于溶液中的蛋白分析。脂肪酸连接的分析一般不可在干胶或固定胶中进行，因为这些过程易于导致转酰基作用，使得活泼的酯键连接到未知化合物上(有可能是酰胺类等)。

1）从新鲜的凝胶中将适当的电泳条带切下，在0.2mol/L KOH的甲醇溶液中室温下振摇一个小时（这可裂解硫酯和氧酯而不是酰胺）。单独用甲醇处理的条带作对照。
2）用新配制的经氢氧化钠滴定至pH7.5的1mol/L羟胺-HCl处理第三条带(可快速裂解硫酯，而对氧酯和酰胺类的作用不大)；用pH7.5的Tris盐酸来处理第四条带作为空白对照。盐酸羟胺在高pH下（pH>9）也能裂解氧酯。
3）用水冲洗胶条5分钟，洗三次，按上述方法制作用于荧光色谱。
   通过以空白对照为参照的荧光信号的衰减来衡量裂解程度，也可通过光密度扫描或闪烁计数来计算裂解的条带。

   注意：去除以硫酯键连接的脂肪酸的功能研究中，在溶液中用羟胺处理可作为一种温和的方法，或者，在体外烷基化的研究中，羟胺处理也可用于制备去烷基化受体蛋白。

结合标记物的蛋白的分析

1）电泳后，借助蛋白分子量标准，或者通过水杨酸钠的荧光色谱来确定目标蛋白带。PPO处理过的胶不宜使用。
2）从干胶或湿胶上将目标蛋白带切下来，用0.5ml水漂洗5分钟（振荡），共洗三次，此时干胶重新水化，水杨酸盐被冲洗干净。
3）将凝胶转移到1.5ml的小离心管中，冻干。另外还可以用浓度为200mg/ml的链霉蛋白酶溶液（在20mmol/L的碳酸氢胺，0.15%的SDS，pH8的溶液中）。37℃下48小时，从凝胶中溶出蛋白，然后冻干。
4）将该小离心管放进带有密封性良好的螺帽的厚壁聚四氧乙烯容器中，旋紧螺帽。加入1ml浓度为6mol/L的盐酸，并用氮气流吹离心管。拧紧盖子，并在110℃的烘箱中水解16小时。
5）用0.5ml的己烷抽提管内的内含物2次，然后合并抽提物。检测己烷提取物及残余

物（溶于 1%SDS 后）的放射性。脂肪酸应被定量提取到己烷中，而掺入到糖或氨基酸中的标记物主要在己烷的残余物中。

6）在真空中蒸干己烷提取物（在一个 SpeedVac），然后溶解在小体积（2～5ml）的氯仿：甲醇（2：1）溶液中，点样到 RP-18 薄层板中，（Merck 13724，Merck，Darmstadt，Germany）最后在乙腈：乙酸（90：10）中展开。将［^{3}H］标记的脂肪酸在平行条带中点样作为标记物。

7）烘干平板，喷射 En^{3}hance 喷射剂（NEN，Herftordshire，UK），在 -70℃，预曝光柯达 XAR-5 胶卷，然后检测放射性；或者刮去 1cm 长的吸附剂后进行闪烁计数测定。

18.2.2 蛋白异戊二烯化的检测

聚异戊二烯化，如法呢基化（15 碳）、香叶基香叶荃化（20 碳），是通过甲羟戊酸途径而衍生出来的，这个途径最终形成大量的细胞代谢物：如甾体、多萜醇、辅酶 Q、血红素等（Goldstein and Brown 1990）。中间产物是活化的焦磷酸衍生物，这是来源于五碳前体——异戊二烯焦磷酸衍生物的聚合物。该途径的第一步就是：甲羟戊酸的生成，它是通过羟甲基戊二酰辅酶 A（HMG-CoA）还原酶催化由 HMG-CoA 产生甲羟戊酸。作用于该酶的几个高效专一性抑制剂已经得到（例如：Mevinolin（lovastatin），Compactin（ML-236B），以及 Pravastatin ），而且已作为抗高胆固醇药物在临床上应用。

这些试剂对 HMG-CoA 还原酶的抑制可引起胞浆中甲羟戊酸的减少，导致非异戊二烯化蛋白前体的积累，异戊二烯的缺乏将引起疏水性的下降，这可通过去垢剂 TritonX-114 的相分配来确定。加入到被处理的细胞中的［^{3}H］标记的甲羟戊酸掺入到积累的前体中，这可通过 SDS-PAGE 检测其条带放射性而被检测。

在观察到［^{3}H］标记的甲羟戊酸掺入到蛋白后，很重要的问题就是要确定聚异戊二烯单元的链长度，可用甲基碘化物使聚异戊二烯单元从蛋白上裂解下来，然后进行 HPLC 分析（Casey et al. 1989）。

甲羟戊酸标记

R-［5-^{3}H］标记的甲羟戊酸是以 50% 的乙醇溶液提供的。在使用之前要通过温和的氮气流将乙醇除去。3-甲羟醛酸不宜在 20℃以上受热，因为它是不稳定的。在除去乙醇之后，将其水溶液直接加到细胞，在含 25～50mmol/L 的 mevinolin 的 FA 培养基中预孵育约 1 小时中，浓度为 50～200μCi/ml，孵育 16 小时。在孵育后期，对细胞进行处理，以备进行免疫沉淀或 SDS-PAGE 电泳（请看**用脂肪酸对组织培养细胞代谢标记**）。

为了获得最高的灵敏度，常用 PPO 作为荧光剂。如果溶解的放射性条带需进一步分析（详见下面）则采用水杨酸钠进行荧光色谱分析，典型的曝光时间大约是一周至一个月。

聚异戊二烯化的 HPLC 分析

1）从干胶上将水杨酸盐荧光色谱确定的条带切下，用荧光谱图作为指导，为了有足够的计数用于分析，在一周内应该有较强的荧光信号。如果需要进行更长时间，则需

要使用多个凝胶带。

2）将凝胶的碎片放到 1.5 ml 的微型离心管中，在室温下用双蒸水冲洗 5 分钟，共三次，以除去水杨酸盐及 SDS，同时也将纸从胶的背面取出。

3）往凝胶片中加 100ml 含 0.02%叠氮钠和 10mg 的链酶蛋白酶的 0.1mol/L 碳酸氢胺溶液，37℃过夜。这将有助于蛋白在胶中的消化和洗脱。

4）将上清去掉，用碳酸氢胺溶液 100ml 和 10mg 链酶蛋白酶 37℃再消化 6 小时。去掉上清，用 200ml 缓冲液在 37℃再提取 2 小时。

5）将三次提取物合并于一个 10 ml 的聚丙烯管中，冻干。用 0.5ml 水重新溶解残余物，冻干。

6）将残余物溶解在 400ml 25mmol/L Tris-Cl（pH7.7）的 80% HPLC 级乙腈溶液中（通氮气流来脱氧），放置于室温一个小时。加 800ml 的通氮气脱氧的 3%（w/v）的甲酸，接着加 100ml 新鲜的甲荃碘化物。通氮气，并在黑暗中室温涡流混合过夜。

7）平缓地抽真空除去甲基碘化物（例如：可用一个水泵），然后加 150ml 35%的碳酸氢钠，通氮气，放置黑暗中缓慢搅拌过夜。

8）用 1.2 ml 的氯仿-甲醇（9：1）连续提取已裂解的聚异戊二烯两次，合并提取物，并计算有机溶剂提取物和水溶液残余物的量。

9）裂解后，在通氮气的情况下干燥氯仿-甲醇的提取物，重新溶解在 100ml 含 25mmol/L磷酸的 HPLC 级的乙腈溶液中（溶液 B）。因为香叶基香叶酯的水溶性较差，所以加高浓度的乙腈是很重要的。在进行 HPLC 分析之前，用等体积的 HPLC 级的水稀释样品，剧烈涡流混匀，离心以除去颗粒状物质。

10）进样（通常为一半）到已经用含 25mmol/L 磷酸的 50%乙腈溶液（溶液 A）平衡好的反相柱子（任何最适于分离的十八烷基或更短的碳链都可使用）流速为 0.5ml/min。溶液 B 是 100%的乙腈/25mmol/L 磷酸。洗脱的梯度是：先用 100%的溶液 A 洗脱 10 分钟，在超过 10 分钟的时间内以线性梯度变到 100%的溶液 B，接着以 100%的溶液 B 洗脱 10 分钟，然后又以反向梯度在 5 分钟变到 100%的溶液 A。按 1 分钟的时间间隔将样品收集到闪烁计小管中，然后加入 5ml 闪烁液进行闪烁计数。用作标记的异戊二烯标准品如下：香叶醇（Sigma，St. Louis，USA）、法呢基醇（Sigma，St. Louis，USA. 或 Aldrich，St. Louis，USA）、香叶基香叶酯（Kuraray Co. Ltd.，Kyoto，Japan）。

（张俊山 译　饶子和 校）

参考文献

Casey PJ, Solski PA, Der CJ, Buss JE (1989) p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. Proc Natl Acad Sci USA 86: 8323–8327

Goldstein JL, Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. Nature 343: 425–430

Gordon JI, Duronio RJ, Rudnick DA, Adams SP, Gokel GW (1991) Protein N-myristoylation. J Biol Chem 266: 8647–8650

Magee AI (1990) Lipid modification of proteins and its relevance to protein targeting.J Cell Sci 97: 581–584

Magee AI, Courtneidge SA (1985) Two classes of fatty acylated proteins exist in

eukaryotic cells. EMBO J 4: 1137–1144.

Magee AI, Gutierrez L, McKay IA, Marshall, CJ, Hall A (1987) Dynamic fatty acylation of $p21^{N\text{-}ras}$. EMBO J 6: 3353–3357

Magee T and Newman C (1992) The role of lipid anchors for small G proteins in membrane trafficking. Trends Cell Biol 2: 318–323

McIlhinney RAJ (1990) The fats of life: the importance and function of protein acylation.Trends Biochem Sci 15: 387–391

Schafer WR, Rine J (1992) Protein prenylation: genes, enzymes, targets and functions. Annu Rev Genet 30: 209–237

Schmidt MFG (1989) Fatty acylation of proteins. Biochim Biophys Acta 988: 411–426.

Sinensky M, Lutz RJ (1992) The prenylation of proteins. BioEssays 14: 25–31

第七部分
质谱在肽及蛋白质分析中的应用

第19章

质谱在肽及蛋白质测序中的应用

B. Thiede

19.1 引　　言

多年来质谱分析被认为是测定小分子的分子量最准确最灵敏的方法。近来在离子化的技术及仪器方面取得了突破性的进展，使质谱所能测定的分子量范围大大超出了10ku。为此，“软”离子化技术、基质辅助的激光解吸/离子化（MALDI）和电喷雾离子化（ESI）显得尤为有前途。这些技术的准确性、灵敏度及分辨力使得测定蛋白质及其他生物多聚体成为可能。通过串联质谱技术（MS/MS）和源后衰减基质辅助的激光解吸/离子化（post-source decay matrix-assisted laser desorption/ionization，PSD-MALDI-MS），人们便可以从质谱分析中获得肽及蛋白质的结构信息。

电喷雾离子化质谱技术（ESI-MS）

ESI 现象是指从分析物溶液中产生裸露的、完整的离子形式分子的过程。在大气压下通过强电场的作用即可产生一股细小的高度带电的小液滴。电喷雾源处的电势比反相电极高很多，离子以气流形式通过反相电极上的小孔进入质谱仪内。液流由注入进样器、分离装置(高效液相色谱，HPLC；毛细管电泳，CE)或其他流速通常在每分钟 1 到几微升的液源产生。由此在毛细管顶部及平板界面间所产生的电场使浸没液体表面带电，在库仑力的作用下使其分散成为一小股带电的小液滴。所形成的微液滴带有过量电荷并被吸到处于低电位的质谱仪进口处。在逆向干燥气体作用下，小液滴溶剂挥发，从而使其直径减小。结果其表面的电荷密度不断增加，直到产生的库仑斥力和液滴表面张力处于相同的数量级的雷利极限为止。由此产生的不稳定性(有时也称为库仑爆裂，Coulomb explosion)促使液滴分裂，形成的带电的子液滴又会蒸发。这一系列过程不断重复进行，最终液滴将变得非常细微。由于液滴的表面电荷密度很大，表面曲率半径又很小，由此形成的电场强度非常大，最终足够使离子从液滴中解析出来并进入气相中。离子解吸机理最终产生了适于质谱分析的“准分子”离子。所形成的裸露分子相对于其在原始溶液中的状态而言均带上了过量的正电荷。这些分子被导入四极质谱进行 m/z 比例分析(Fenn 1989)。

毫微电喷雾离子源与快速脱盐浓缩步骤偶联在一起，允许分析不纯样品如凝胶酶切后提取出的肽混合物（Wilm 1996)。

ESI 质谱常规能在 5 ~ 10 分钟内，从浓度约 10 fmol 的溶液中获取精度为 0.01%、分辨率约 1000，对于 m/z 测量范围在 2500 以内的四极质谱仪而言，用电喷雾可以成功地

测定 200ka 的分子离子的分子量。液相色谱及毛细管区带电泳等分离方法与其在线偶联是分析的最佳选择。

基质辅助的激光解吸离子化质谱（MALDI-MS）

在运用 MALDI-MS 时，将被分析的分子加入含有基质（如二羟基苯甲酸及肉桂酸的系列衍生物）克分子大大过剩的浓缩液体中，然后再将溶液置于探针的顶端进行干燥并将其送入质谱仪内部（HillenKamp 1991）。薄层技术是另一种制备方法，基质先快速蒸发生成一薄层，然后将待分析的溶液沉积于薄层之上（Vorm 1994）。

在质谱仪中用紫外波长的短脉冲（1 ~ 10ns）照射样品，适当的基质在该波长内有很强的吸收峰。与激光脉冲间的相互作用导致了基质和待分析的分子解吸和离子化。样品探针与加速电极在空间上靠得很近，在样品探针上加上一高电压(通常为 25 ~ 30kV)，从而在由样品产生的离子上加一很强的电场，待测离子因而加速通过电极的窒口，进入一无电场的飞行管中(通常为 50 ~ 200cm 长)。待测离子质量可以通过分析飞行时间(TOF)来测定。当离子通过无电场飞行管时，他们在空间上分离成为一系列不连续的独立离子群，他们各自的飞行速度与$(m/z)^{1/2}$成正比。在飞行管的端部装有一探测器，每次离子群与之相碰的便会产生一信号。起始时间由激光脉冲的出现来测定，对所有的离子而言都是相同的。起始时间与各离子达到探测器的时间之差可以用于计算离子的质荷比。

除了线性仪器外，还有反射质谱议用来补偿初始能量的扩散。在这些装置中离子反射仪装于飞行途径中，使由初始速度分散引起的峰宽能够基本得以矫正，这使得稳定离子的质量测定的分辨率得以提高。

分子量超过 300ka 的分子现已可用 MALDI-MS 成功测定。实际可能测量的分子量范围看起来几乎是无限制的。在分析中仅需 10^{-15}mol 样品。并在 5 分钟内能完成。质量测定的准确度与被分析物的大小有关，在 0.01% ~ 0.1%内波动。

MALDI 傅里叶变换质谱（Castoro 1992）、延迟分离法（Brown 1995）等技术的发展都是获得高质量精确度、高质量分辨率的很有前途的方法。

串联质谱（MS/MS）

质谱分析中的又一发明是使用了串联装置，即把两套质谱依次连在一起，鉴定混合物中的生物大分子而不必预先将组分分开（Biemann 1987；Hunt 1986）。质子化的分子离子产生于第一个质谱仪内，并从混合物中将前体离子挑选出来，用碰撞致解体的方法（CID）来获得碎片，即让离子与中性原子（如氦）相碰或使用其他方法（如光激发）所产生的离子在第二个质谱仪中进行分析。

源后衰减-基质辅助的激光解吸离子化质谱（PSD-MALDI-MS）

激光的解吸附离子团具有源后衰减的趋势，这一点可用来阐明肽及蛋白的结构（Spengler 1991）。在通过 TOF 装置时，蛋白及肽变得尤为不稳定，基质解吸离子的亚稳定的衰变能够被反射子装置测到。因此反射子的电动势必须根据亚稳定的离子碎片的剩余动能来加以调节。为了获得这些离子的完整质谱，需要将反射子的势能逐步从标称值减至零而获得一系列的质谱。混合物中的不同离子可以不通过离子闸而加以筛选。

MALDI 质谱中额外引入了碰撞室，从而使亮氨酸和异亮氨酸能够加以区分。

未知肽和蛋白的序列测定

常规情况下，可通过逐步 Edman 降解来直接测定氨基酸序列，或通过 DNA 测序来间接测定。Edman 降解的局限性主要在于不能对环形肽链及 N 端被封闭的肽及蛋白进行测序，也不能测知某种被修饰的氨基酸。而测定基因组的碱基序列则不能测知翻译后的修饰情况。

以上这些难题可用 MS/MS 或 PSD-MALDI-MS 来加以解决。在蛋白测序过程中，蛋白必须使用特异性蛋白酶或某些化学试剂降解以产生肽。通过所得到的众多波谱，可完全了解其序列。可能会导致出现问题的主要有：缺少一个或几个完整的离子系列；两个 N 端氨基酸之间或(和)C 端氨基酸间没有断片；缺少区分亮氨酸和异亮氨酸所需的“次级离子”；形成超过 20 ~ 30 个氨基酸的肽链；形成的肽与基质离子质量相同。各个肽在蛋白链上的排列情况也是未知的。基于以上原因，在进行蛋白测序时需对蛋白进行多种酶解。

将 Edman 化学降解与 MALDI 质谱相结合使得蛋白测序的两种方法已经发展，此即所谓的 Ladder 测序（Chait 1993，Bartlet-Jones 1994）。Chait 在 Edman 化学降解中用 5% 异氰酸苯酯作为末端反应剂，与整条肽链形成苯氨甲酰衍生物，而 95% 仍像往常一样在用三氟乙酸解离后与异硫氰酸苯酯反应以形成缩短了一个氨基酸的肽链，在剩下的降解多肽上连续运用 Edman 降解循环，最终苯氨甲酰化多肽的混合物通过 MALDI-MS 一步完成分析。Bartlet Jones 则采用挥发性的试剂，用三氟乙基异硫氰酸作为耦联剂，七氟丁酸作为裂解剂以避免在多肽分离过程中丢失，每次循环均加入等量新鲜的肽并最终使偶联和裂解反应趋于完全，这样便会产生一系列多肽通过 MALDI 质谱得出序列。这方法对于分子量达 4000 Da 的肽限于质量精确度为 0.01%，而且亮氨酸和异亮氨酸也不能仅由质量测定来区分。

另一种将质谱分析（尤其是 MALDI-MS）与 Edman 化学降解偶联起来测定未知蛋白序列的方法，以 1pmol 蛋白为起始量，其在酶解或化学裂解下的时间历程用 MS 来进行监测（Roepstorff 1993）。消化后用 HPLC 将肽分离，再用 MS 和（或）氨基酸分析进行测定，接下来再使用 Edman 降解。肽分子量的测定结果可用于估计所需进行的循环次数并确认测序结果，修饰过的氨基酸也可测定出来，进而把肽的分子量相加再与完整蛋白的分子量相比较，可把对应于完整序列的肽挑选出来进行测序。到此，大部分序列均被测定。采用另一种水解方式后也可用同样的方法来处理。N 末端封闭的情况可以通过氨基酸分析与质谱测定的结果进行比较来鉴定。

在羧肽酶解和 MALDI-MS 的共同作用下，C 末端的序列信息可以通过测定截短的肽来获得（Thiede 1995）。

已知蛋白的鉴定

在研究蛋白质的过程中，一种蛋白是否已知或与某种已知蛋白相关是一个关键的问题。用 DNA 测序或蛋白测序获得的蛋白序列均存放于蛋白序列的数据库中，整个蛋白的分子量通过 ESI 质谱和 MALDI 质谱便可很容易地得到，可用于在数据库中进行搜索（Mann 1993）。因此，初步的推断可以得到，它必须经过进一步的研究。

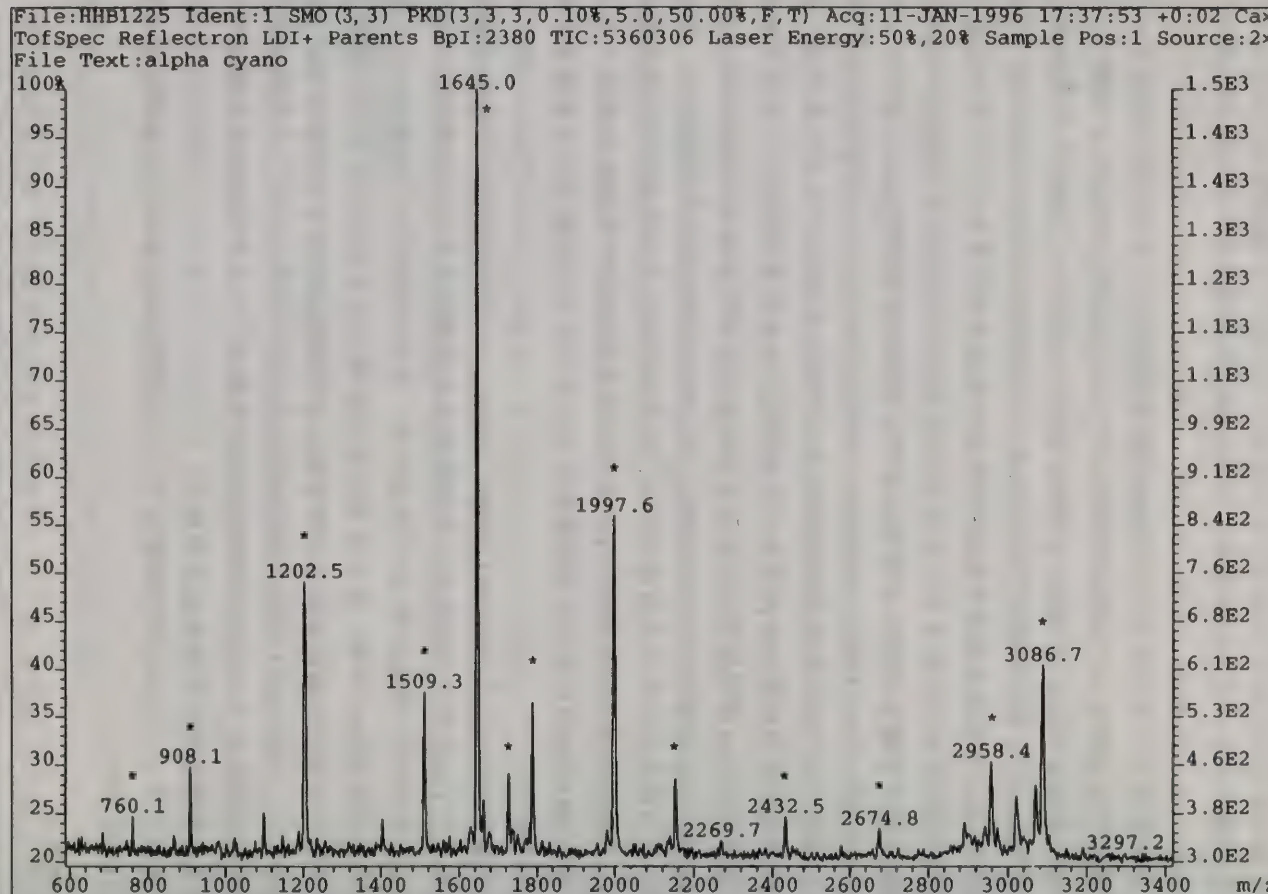


图19.1　肌酸激酶M-链的Lys-C降解的MALDI-MS图谱。蛋白来源于人心肌的双向电泳(Jungblut 1994)。用星号标记的13个峰与肌酸激酶M-链的肽相匹配，且明确地鉴定了蛋白。

对序列数据库中酶解或化学裂解的肽片断作分子量搜索（mass mapping），即可更为特异地来鉴定某一蛋白，而且这种方法还可运用于双向凝胶电泳所分离得的蛋白上（Henzel，1993）（图 19.1）。混合物中选定的肽的其他序列信息可以通过 PSD-MALDI 质

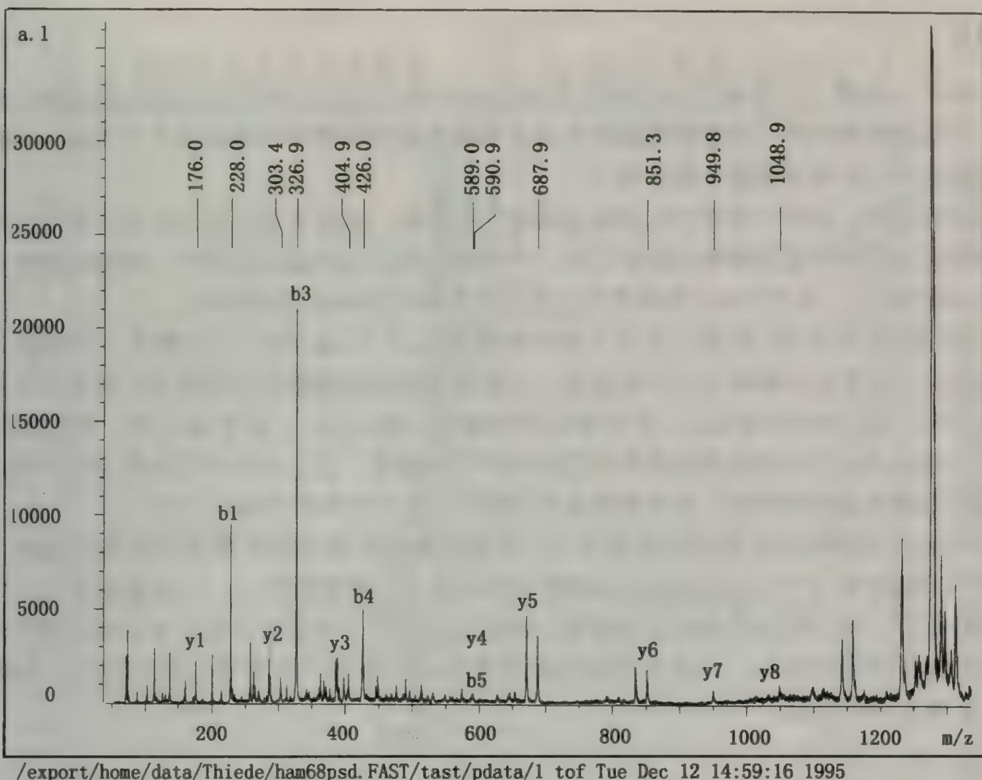


图 19.2 β-血红蛋白的胰蛋白酶肽的 PSD-MALDI-MS 图谱。蛋白来自于人心肌双向电泳（Jungblut 1994）。根据 Roepstorff（1984）的命名法，用 b 和 y 离子表示，碎片类型证明该蛋白为 β-血红蛋白。

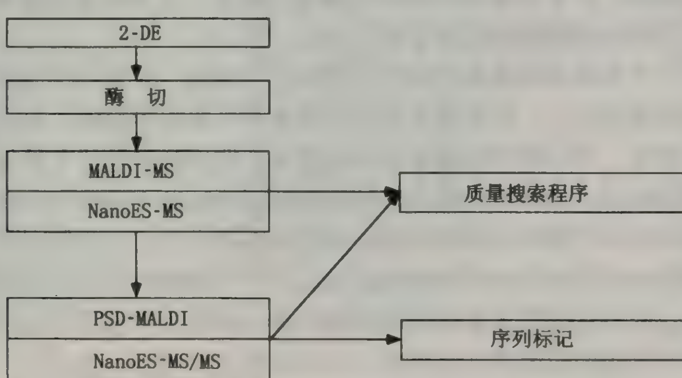


图 19.3 2-DE 胶上蛋白质的质谱鉴定（未进行 HPLC 分离）。

谱（图 19.2)及 nanoES-MS/MS（图 19.3）获得。而且，序列标记方法还可用于鉴定只有两三个氨基酸的多肽（Mann 1994)。

选择性翻译后修饰

磷酸化

特定丝氨酸、苏氨酸及(或)酪氨酸的羟基的磷酸化是一种常见的蛋白质翻译后修饰。对真核生物而言，蛋白质的磷酸化及去磷酸化是调节胞内功能的最重要机制，这其中包括对信号转导及细胞分裂的调节。

现已发展了几种方法用于决定蛋白磷酸化的位点，这些方法大体上思路：先用化学或酶解的方法使磷蛋白降解为多肽片段，再分析这些片段的组成及序列，磷酸肽图谱已用于 SDS-PAGE、反相 HPLC 双相薄层色谱分离及自动 Edman 序列分析。

MALDI 质谱及 ESI 质谱已经用于鉴定磷酸化位点（Liao 1994)。将磷蛋白用特定的酶解反应及化学反应降解成为小的肽后，比较碱性磷酶脱磷酸前后的质谱，如果分子量减少了 80（或 80 的倍数值），即可确定出磷酸肽（图 19.4)。如果蛋白的一级序列已知，则通过多肽片段的质量图谱即可定出磷酸化的位置，蛋白水解产生的混合物可通过 MALDI 质谱直接进行分析，也可选用反相 HPLC 分离后再用质谱进行分析。

与其他方法相比用 MALDI 质谱及 ESI 质谱在磷蛋白鉴定及磷酸化位点的定位其优越性在于精度高（<0.1%)，具有分析混合物的能力，且耗时很少。而对那些量很小的磷蛋白而言，高灵敏度就显得尤为重要。在许多情况下，所描述的技术可运用多种酶切方法来获得所需的信息。如果在推定的磷酸化位点间不能进行切割，则可通过 CID 或 PSD 来测定序列位置。

糖基化

将糖类化合物连接到蛋白质上是真核生物中最常见的翻译后修饰。糖基化形式有两种，即 N-糖基化和 O-糖基化，其类型取决于与糖基连接的蛋白质上的原子。N-糖基化只发生在天冬酰胺的侧链 N 原子上，而 O-糖基化则发生于羟基的 O 原子上，尤其是丝氨酸和苏氨酸残基。由于与蛋白相连的糖基结构复杂，对其描述比较困难，至少有 8 种糖单体，与不同的功能群团通过糖苷键连接在一起。

测量糖肽的分子量是测定糖基组成的先决条件，为此，糖蛋白应先进行酶解。在应用化学裂解法时应加倍小心，因为糖苷键在裂解条件下变得不稳定。通过测定特定糖苷酶处理前后的分子量，可以推知糖肽所含有的糖基，把所测得的分子量与数据库相联系有助于确定糖基的组成，因为对于大多数组分糖基组分间分子量的兼并性很小。然而端基异构和连接异构体及己糖和己糖胺的各种形式却不能只通过质量测定来区分出来。

ESI 质谱和 MALDI 质谱已可用于鉴别亚 pmol 水平的糖蛋白。由于 MALDI 质谱不易受缓冲液的影响，因此它是测定由几种特定糖苷酶水解引起的分子量变化的理想技术，进而比较线性和反射式谱表面在许多事件可引起质量变化（Huberty 1993)。此观察表明 silalyated 糖肽的亚稳衰变或大多数神经氨酸残基的丢失。已糖及已糖胺的丢失现象也被观测到了。在 PSD 试验中，逐步减少反射子的势能即可产生与多肽和寡糖结构相联的离子片段，而且，MS/MS 已用于确定糖肽（Richter 1990)。在用糖苷酶水解后研究完全

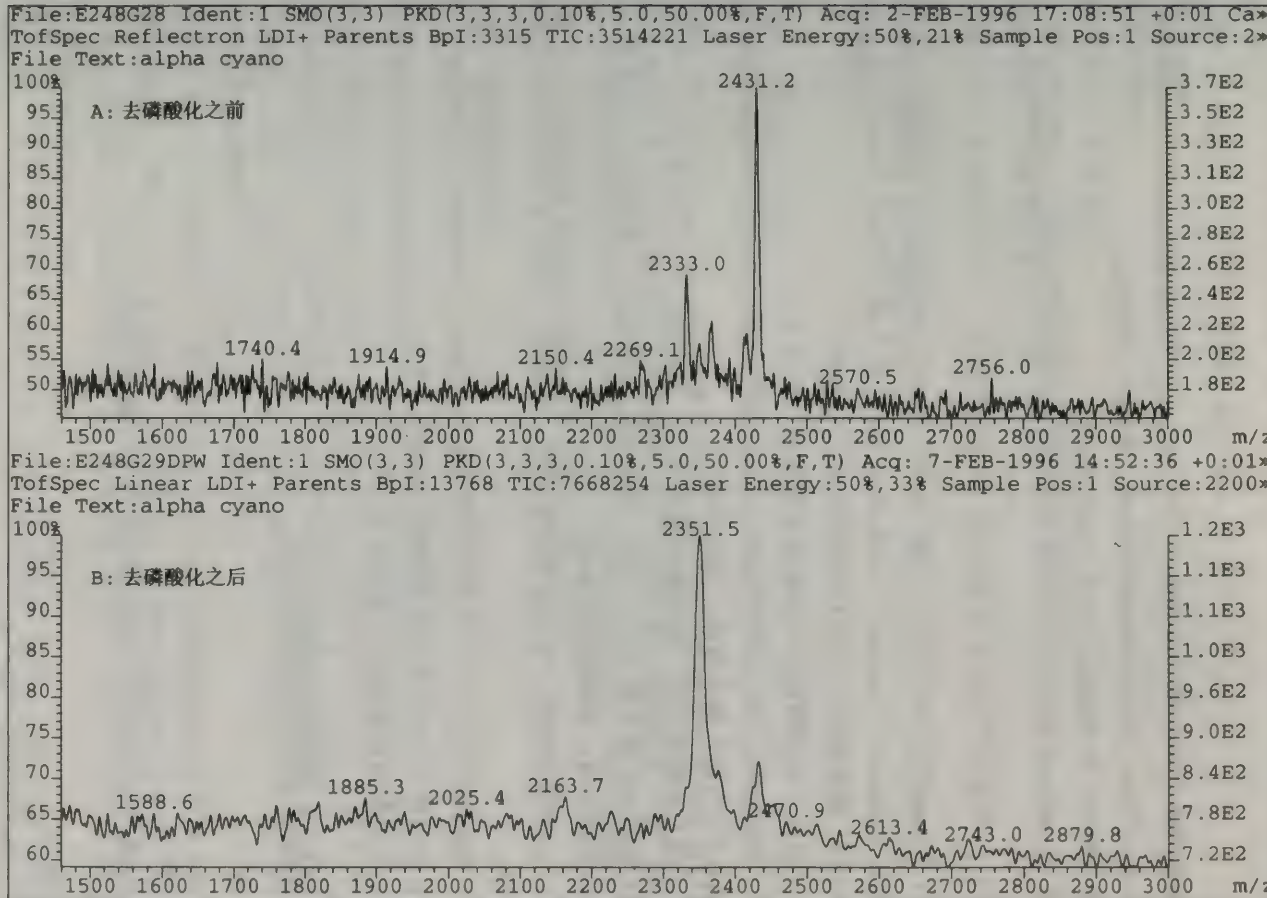


图19.4 A，B肌球蛋白轻链2的Lys-C多肽的MALDI-MS图谱。A为碱性磷酸酶脱磷酸前；B为脱磷酸后。

的糖肽或分离了的肽链以及糖或寡糖后，再与化学衍生化作用相结合即可获知更多的信息，尤其是寡糖含量的信息。

19.2 材　　料

仪　器

— 基质辅助的激光解吸/离子化质谱仪（VG TofSpec，Fisons Instruments，Manchester，UK 和 Bruker-Reflex，Bruker-Franzen-Analytik，Bremen，Germany）
— 涡漩器（Bender 和 Hobein，Zurich，Switzerland）
— 离心机（Centrifuge 5415C，Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH，Hamburg，Germany）

试　剂

— 基质 1：50mmol/L α-氰-4-羟肉桂酸（CCA；Sigma，Deisenhofen，Germany）40%乙腈（Merck，Darmstadt，Germany），60%的 0.1%三氟乙酸水溶液（Merck，Darmstadt，Germany），旋涡搅拌，并以 12 000r/min 离心 2 分钟。

注意：CCA 为饱和溶液，每周配制新鲜溶液，存于 4℃。

— 基质 2：50mmol/L α-氰-4-羟肉桂酸（CCA），99%丙酮（Merck，Darmstadt Germany），1%的 0.1%三氟乙酸水溶液，搅拌并离心。

注意：CCA 为饱和溶液，每周配制新鲜溶液，存于 4℃。

— 基质 3：50mmol/L 芥子酸（SA；Fluka，Nen-Ulm，Germany），30%乙腈，70%的 0.1%三氟乙酸水溶液，旋涡搅拌并离心。

注意：SA 为饱和溶液，每天配制新鲜溶液，并保存于 4℃，M+206 为芥子酸加合物信号。

— 基质 4：100mmol/L，2，5-二羟基苯甲酸（DHB，Sigma，Deisenhofen，Germany），30%乙腈，70%的 0.1%三氟乙酸水溶液，搅拌并离心。

注意：每周配制新鲜 DHB，并保存于 4℃。

19.3 MALDI 质谱的制备方法

液滴干燥法

1）溶解样品。

注意：大多数多肽及蛋白可溶于 30%的乙腈/70%的 0.1%三氟乙酸水溶液。

2）旋涡搅拌。

3）短时间离心。

4）将基质 1 或 3 或 4 放于靶子上。

注意：CCA 主要用于分子量达 10 kDa 的肽测定，SA 对分子量超过 3kDa 的肽及蛋白效果好，而 DHB 则适用于糖蛋白。

5）将样品加于靶子的基质中。

注意：基质溶液量与样品溶液量之比应约为 3∶2～1∶1 之间。

6）将干燥的靶子导入质谱仪内。

7）记录质谱。

薄层方法

1）溶解样品。

注意： 大多数多肽及蛋白质可溶于 30%的乙腈/70%的 0.1%三氟乙酸水溶液。

2）旋涡搅拌。

3）短时间离心。

4）将基质 2 置于靶子之上。

注意： 对不同把子，其基质 2 的量必须优化；干燥时间不应超过 10 秒。

5）将样品加于干燥基质之上。

6）干燥之后，洗涤样品三次，洗涤方法：将 1μl 水置于顶端，再将水吹走（可用压缩空气），如此反复三次。

7）将干燥的靶子导入质谱仪内。

8）记录质谱。

19.4 结果与讨论

蛋白质（如从双向电泳中获得的蛋白）可通过肽质量指纹分析法来加以确定（图 19.1），然而并非在任何情况下均可鉴定成功，为此还需要别的鉴定方法。使用相同的样品，对多肽质量指纹中的一个肽进行 PSD-MALDI 质谱分析，则可获知其序列信息（图 19.2），质谱是鉴定翻译后修饰的理想方法（图 19.3）。

19.5 疑难解析

- 避免使用非挥发性的试剂如盐类（例如，NaCl，KH_2PO_4，$CaCl_2$）、去污剂（如 Triton，SDS）、溶剂（如甘油，DMSO）。如果这些试剂在纯化过程中不能避免使用，用 RP-HPLC进行纯化。有时稀释样品可以得到相应的质谱。挥发性试剂，如碳酸氢铵、乙酸铵、乙腈、三氟乙酸等，均适于 MALDI 质谱。对去污剂而言，我们推荐使用 1%辛基糖吡喃糖苷（β-octylglycopyranoside）。
- 在进行 MALDI 质谱分析时只需 fmol 水平的样品，而所需样品的确切量取决于样品种类（肽蛋白，糖蛋白）、分子量（分子量越大，所需样品越多）及纯度（非常重要）。
- 在允许的情况下尽量使用反射模式。在研究混合物时，使用线性模式有时可更容易检测到一些较小的波峰。
- 基质离子可用于检测校准（CCA:190.1/379.1;SA:225.1/449.1;DHB:155.0/309.1）。

（陈宇航 译　饶子和 校）

参考文献

Bartlet-Jones M, Jeffery WA, Hansen HF, Pappin DJC (1994) Peptide ladder sequencing by mass spectrometry using a novel, volatible degradation reagent. Rapid Commun Mass Spectrom 8:737–742

Biemann K, Scoble HA (1987) Characterization by tandem mass spectrometry of structural modifications in proteins. Science 237:992–998

Brown RS, Lennon JJ (1995) Sequence-specific fragmentation of matrix-assisted laser-desorbed protein/peptide ions. Anal Chem 67:3990–3999

Castoro JA, Köster C, Wilkins CL (1992) Matrix-assisted laser desorption/ionization high-mass molecules by Fourier-transform mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 6:2621–2627

Chait BT, Wang R, Beavis RC, Kent SBH (1993) Protein ladder sequencing. Science 262:89–92

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science 246:64–71

Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C (1993) Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. Proc Natl Acad Sci 90:5011–5015

Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT (1991) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. Anal Chem 63:1193A-1203A

Huberty MC, Vath JE, Yu W, Martin SA (1993) Site-specific carbohydrate identification in recombinant proteins using MALD-TOF MS. Anal Chem 65:2791–2800

Hunt DF, Yates III JR, Shabanowitz J, Winston S, Hauer CR (1986) Protein sequencing by tandem mass spectrometry. Proc Natl Acad Sci 83:6233–6237

Jungblut P, Otto A, Zeindl-Eberhart E, Pleiβner KP, Regitz-Zagrosek V, Fleck E, Wittmann-Liebold B (1994) Protein composition of the human heart: The construction of a myocardial two-dimensional electrophoresis database. Electrophoresis 15:685–707

Liao PC, Leykam J, Andrews, PC, Gage DA, Allison J (1994) An approach to locate phosphorylation sites in a phosphoprotein: mass mapping by combining specific enzymatic degradation with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Anal Biochem 219:9–20

Mann M, H¢jrup P, Roepstorff P (1993) Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. Biol Mass Spectrom 22:338–345

Mann M, Wilm, M (1994) Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. Anal Chem 66:4390–4399

Richter WJ, Müller DR, Domon B (1990) Tandem mass spectrometry in structural characterization of oligosaccharide residues in glycoconjugates. Meth Enzym 193:607–623

Roepstorff P, Fohlmann J (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. Biomed Mass Spectrom 11:601

Roepstorff P, H¢jrup P (1993) A general strategy for the use of mass spectrometric molecular weight determination in protein purification and sequence determination. In: K. Imahori, F. Sakiyama (eds) Methods in protein sequence analysis. Plenum, New York pp 149–156

Spengler B, Kirsch D, Kaufmann R (1991) Metastable decay of peptides and proteins in matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 5:198–202

Thiede B, Wittmann-Liebold B, Bienert M, Krause E (1995) MALDI-MS for C-terminal sequence determination of peptides and proteins degraded by carboxypeptidase Y and P. FEBS Lett 357:65–69

Vorm O, Roepstorff P Mann M (1994) Improved resolution and very high sensitivity in MALDI TOF of matrix surfaces made by fast evaporation. Anal

Chem 66:3281–3287
Wilm M, Shevchenko A, Houthaeve T, Breit S, Schweigerer L, Fotsis T, Mann M (1996) Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. Nature 379:466–469.

第20章

羧肽Y和P酶水解与基质辅助的激光解吸/电离质谱相结合的羧端测序

B. Thiede

20.1 引　　言

羧端序列信息在以下几方面特别令人感兴趣：①研究N端封闭的肽及蛋白；②鉴定由双向聚丙烯酰胺凝胶电泳（2-DE）分离得到的蛋白；③确证DNA序列据；④克隆实验；⑤表征重组蛋白。现已发展出了用于C端序列分析的化学方法（综述见Inglis 1991）。然而还没有任何一种方法的结果能与进行N端序列分析的Edman化学降解法（Edman 1976）相比。在进行C端序列分析的实验中，经常会使用羧肽酶，通过鉴定得到的游离氨基酸或用质谱测定切割所得的肽链来进行分析。由于基质辅助激光解吸/电离质谱（MALDI质谱）（Hillenkamp 1991）具有高灵敏度（fmol ~ pmol水平）而且不易受多种缓冲液的影响，因而在对由酶解所得到的多肽混合物进行研究时，它是理想的工具（Henzel 1993）。羧肽酶对不同的氨基酸及不同肽键具有不同的作用效果（综述见Breddam 1986）。在羧肽酶Y及羧肽酶P共同作用下，于水解后的不同时间用MALDI-MD样品的质量，即可得到多种氨基酸的C端切割肽（图20.1）(Thiede 1995)。

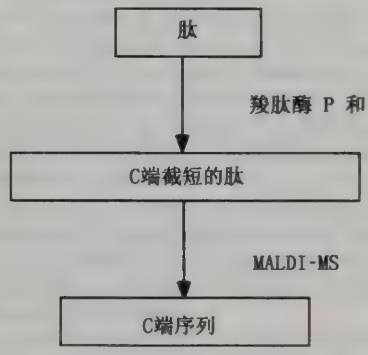


图20.1　羧肽酶P和Y降解与MALDI-MS结合测定羧端序列的流程图。

肽质量指纹法（peptide mass fingerprinting）是鉴定蛋白的有力工具，尤其是那些来源于双向电泳的。然而确定的鉴定有时是很复杂的。在不使用更多材料的前提下，对由微量HPLC方法分离的肽，用羧肽酶P及Y进行针对靶子的处理，并用MALDI-MS质谱在酶解前后进行质谱的测定，可使这种方法更加可靠。这种方法可用于蛋白质的鉴定，特别是当材料很少，其他低灵敏度的方法无能为力时，该法尤为适用。

20.2 材　　料

仪　器

基质辅助的激光解吸电离质谱仪，如 FISONS Instruments TofSpec（Manchester，UK）

试　剂

— 基质 1：50 mmol/L α-氰-4-羟基肉桂酸（Sigma，Deisenhofen，德国），50%乙腈（Mark，Darmstadt，Germany），50%的 0.1%三氟乙酸水溶液，（Merck，DarmStadt，Germany）。

— 基质 2：50mmol/L，α-氰-4-羟基肉桂酸，99%丙酮（Merck，Darmstadt，德国），10%的 0.1%三氟乙酸水溶液。

— 降解缓冲液：10mmol/L 柠檬酸钠（pH5.0），羧肽酶 P 及羧肽酶 Y（均为序列分析级，Boehringer-Mannheim，Mannheim，德国）。

20.3 试验方法

羧肽酶 P 及 Y 酶解的时间监测

1）将样品溶于 8μl 水解缓冲液中。

注意：应该同时使用控制肽（如 40pmol P 物质，Bachem，Heidelberg，Germany）以保证羧肽酶的质量，并检查质谱仪基准。

2）在 8 个试管中分别加入 1.2μl 基质 1。

3）加 0.8μl 样品溶液到 8 个管中之一试管中。

4）将 1.0μl 羧肽酶 Y 和 P（1∶1）加入样品溶液中，酶与样品的比例为 1∶50（重量之比）。

5）分别在酶解后的 1，2，5，10，15，30，60 分钟分别取 0.8μl 水解混合物样品，将每次取的试样分别加入含有基质 1 的试管。

注意：pH 值小于 2 的基质 1 可作为终止溶液。

6）将各混合物 2μl 加在靶子上。

注意：加到靶上的量可随靶的大小不同而不同.

7）风干后将靶子引入质谱仪内。

8）记录 8 个样品的质谱。

9）把所得质谱进行比较并计算出从质谱最高的（起始肽）到最低的差别，从质谱的差别中可以测定从 C 端切割下来的氨基酸（甘氨酸 57.1，丙氨酸 71.1，丝氨酸 87.1，脯氨酸 97.1，缬氨酸 99.1，苏氨酸 101.1，半胱氨酸 103.2，亮氨酸 113.2，异亮氨酸 113.2，天冬酰胺 114.2，天冬氨酸 115.1，谷氨酰胺 128.1，赖氨酸 128.2，谷氨酸 129.1，甲硫氨酸 131.2，组氨酸 137.2，苯丙氨酸 147.2，精氨酸 156.2，酪氨酸 163.2，和色氨酸 186.2 ）。

注意：亮氨酸/异亮氨酸和谷氨酰氨/赖氨酸间的区别不能通过 MALDI 质谱得出，某些氨基酸之间的区别则依

赖于质谱测定的精密度。

在靶子上羧肽酶 P、Y 的水解

1）将 1.0μl 基质 2 加于靶子上。

注意：对不同的靶子所加入基质 2 的量应选择合适，最多干燥 10 秒（Vorm et al. 1994）。

2）将样品溶于 0.8μl 0.1%的三氟乙酸中，并将它放在靶子上的干燥基质上。

注意：同时应加入一控制肽（如 5pmol P 物质）以确认羧肽酶的质量及检查质谱仪是否校准。

3）待测样品干燥以后，将 2.0μl 水置于样品之上，并立即将水吹走（如用压缩空气）以冲洗样品。

4）将干燥的靶子导入质谱仪内。

5）记录质谱。

注意：如无信号出现，则重复步骤 3，4。

6）将靶子从质谱仪中取出。

7）将 0.8μl 羧肽酶 P 和 Y（1∶1）加于靶子的样品之上并使其（自然）干燥，酶同底物质量之比约为 1∶50。

8）重复步骤 3 两次。

注意：如果质谱出现了许多钠加合物的液峰，则冲洗步骤应该再次重复。

9）干燥后靶子导入质谱仪内。

10）记录质谱。

11）计算出从质谱最高的（母肽）到最低的差别，从质谱的差别中可以确定 C 端切割下来的氨基酸（质谱差异如上）。

注意：在许多情况下，质谱会记录下钠加合物的波形。

20.4 结果与评论

羧肽酶 P、Y 水解 P 物质（1347.5Da）的时间监控质谱见图 20.2。在水解后的 1 分钟，可以测知四个切割肽的质谱（图 20.2A），在羧肽酶保湿 5 分钟后，又可观测到另一质量（图 20.2B），在 1 小时内没有进一步的降解发生。质量从最高到最低的差值分别为 130.3（Met）、113.1（Leu/Ile）、57.2（Gly）、147.1（Phe）及 275.3（Phe + Gln/Phe + Lys）。所测得的质量为 754 的切割肽的峰值很弱，在这种情况下，由降解得到的二肽引起的质量之差可以确定顺序未知的氨基酸。

在用在靶上的羧肽酶水解结蛋白 414 ~ 427（1649.6u）之前（图 20.3A）及之后（图 20.3B）进行质谱分析，这样便可测定 C 末端的三个氨基酸，钠加合物（+22μ）的质量从最高至最低的质量逐次为 156.4（Arg），146.9（Phe）及 114.2（Asn）。对人的心肌蛋白进行双向凝胶电泳而分离得到的结蛋白（desmin）片段（Jungblut 1994），将蛋白印迹到 PVDF 膜上，用胰蛋白酶水解后，将多肽从膜上洗脱下来，再用微孔 HPLC 进行分离，肽的质量指纹分析及 C 端序列信息毫无疑问地证实了该蛋白为结蛋白。

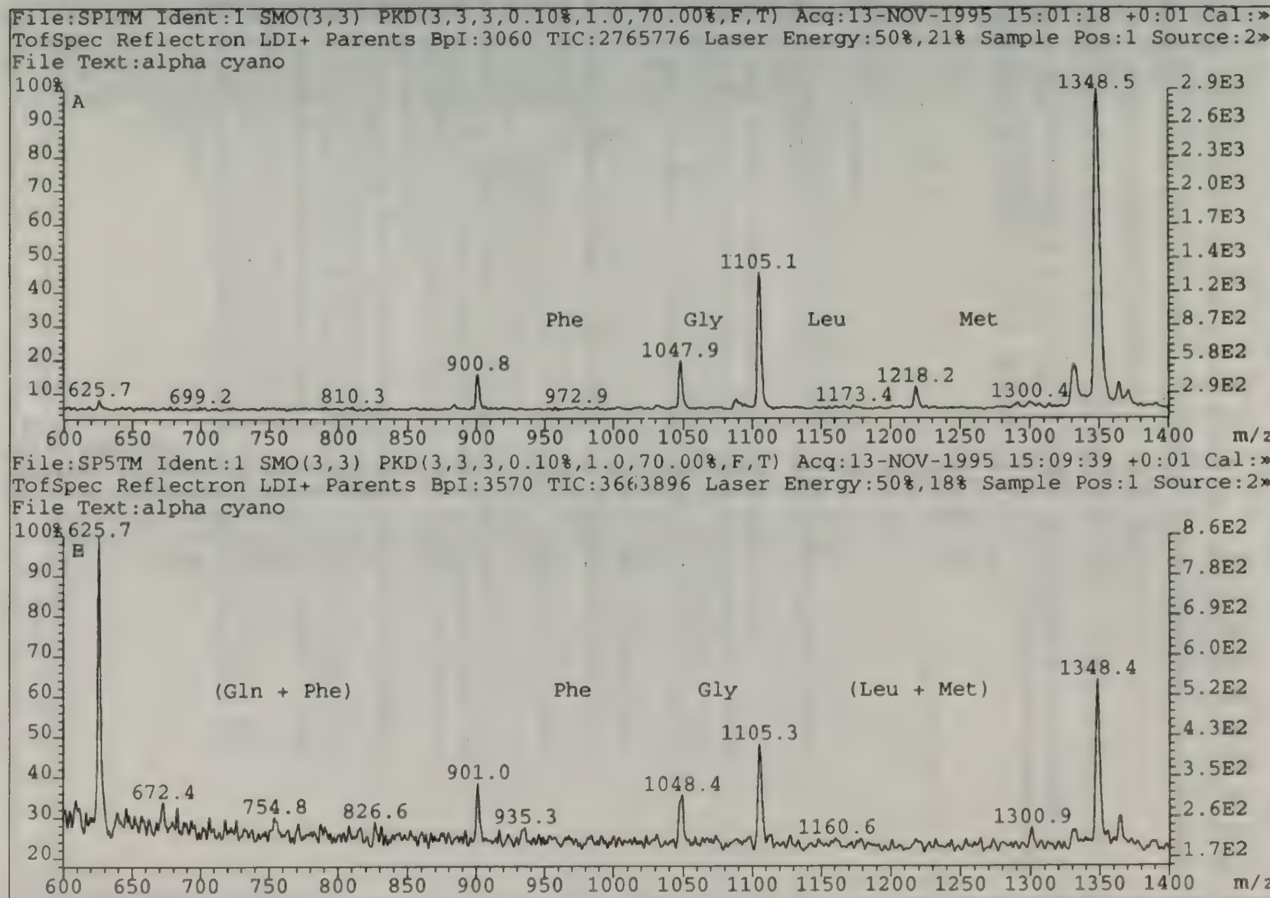


图20.2　A, B. 时间监测的羧肽酶P和Y降解的P物质质谱，A为1分钟，B为5分钟。

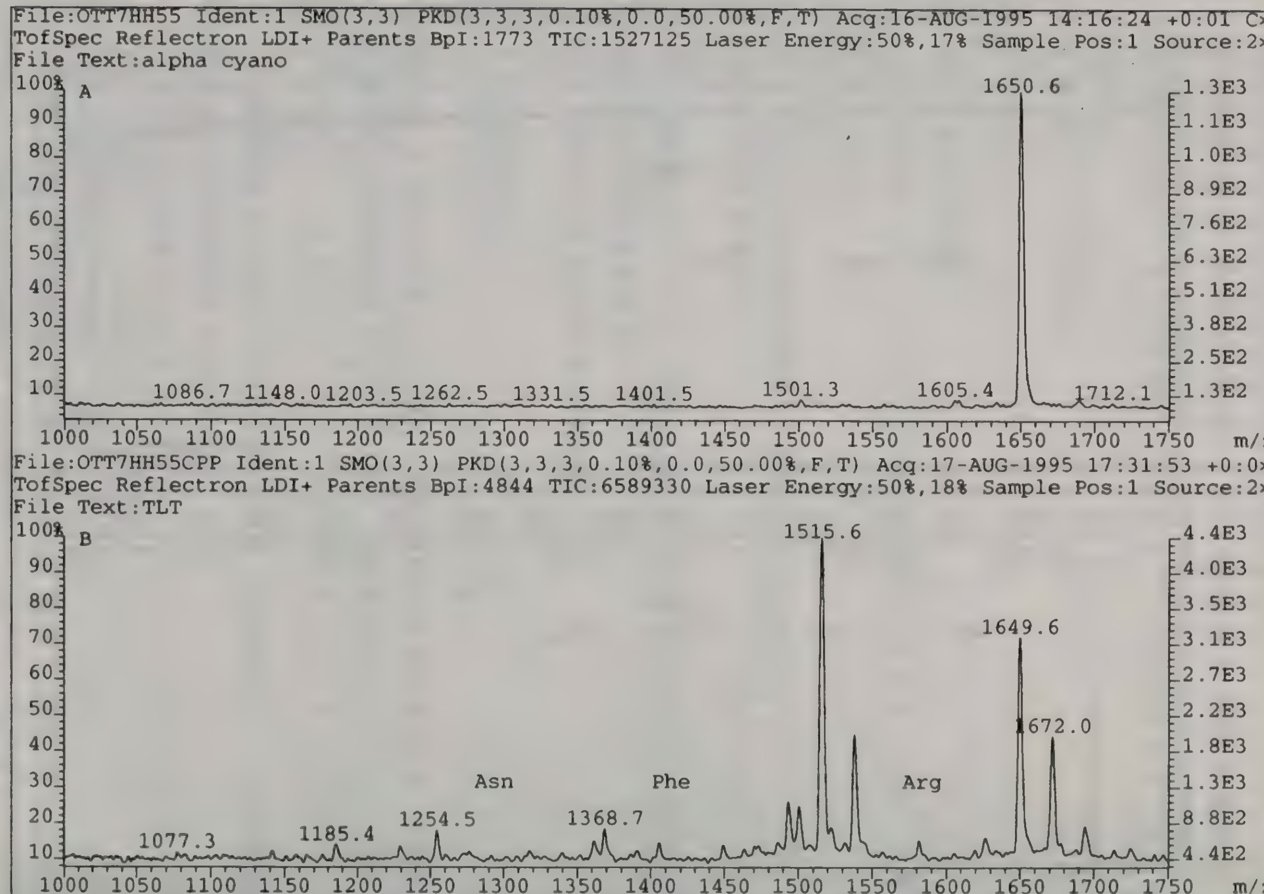


图20.3　A,B在靶上羧肽酶P和Y对结蛋白 414～427 的降解质谱，A为降解前，B为降解后。

20.5 疑难解析

- 酶解释放不同的氨基酸差别很大，有时根本就不能酶解。
- 有时可能会发生内部切割释放二肽。
- 如果水解过快最先释放的氨基酸可能测不到，在这种情况下，另取一新样品，在较低温度下重复做实验（如 10℃）。在进行时间监测的试验时，还应另外增加两个取样点：一个是加入羧肽酶后立即取样，一个是 30 秒之后。
- 水解氨基酸有时会很慢。在进行时间监控的试验时，剩余的样品（3.4μl）可以在高温下（如 37℃）酶解更长的时间。对靶子上的样品进行较长时间酶解时，可通过增加羧肽酶溶液的体积如（2μl）来达到。

（陈雪晖 译　饶子和 校）

参考文献

Breddam K (1986) Serine carboxypeptidases. A review. Carlsberg Res Commun 51:83–128

Edman P, Begg G (1967) A protein sequenator. Eur J Biochem. 1:80–91

Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C (1993) Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. Proc Natl Acad Sci 90:5011–5015

Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT (1991) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. Anal Chem 63:1193A-1203A

Inglis AS (1991) Chemical procedures for C-terminal sequencing of peptides and proteins. Anal Biochem 195:183–196

Jungblut P Otto A, Zeindl-Eberhart E, Pleißner KP, Regitz-Zagrosek V, Fleck E, Wittmann-Liebold B (1994) Protein composition of the human heart: The construction of a myocardial two-dimensional electrophoresis database. Electrophoresis 15:685–707

Pappin DJC, Hojrup P, Bleasby AJ (1993) Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. Current Biology 3:327–332

Thiede B, Wittmann-Liebold B, Bienert M, Krause E (1995) MALDI-MS for C-terminal sequence determination of peptides and proteins degraded by carboxypeptidase Y and P. FEBS Lett 357:65–69

Vorm O, Roepstorff P, Mann M (1994) Improved resolution and very high sensitivity in MALDI TOF of matrix surfaces made by fast evaporation. Anal Chem 66:3281–3287

第21章

生物大分子的结晶

F. Franceschi

21.1 引　　言

描述关于某一特定蛋白或核酸蛋白复合物的结晶条件，对打算结晶完全不同的分子或从不同生物体中提取出的同源蛋白而言意义不大。因此本章的重点放在结晶的一般原则及一些有关生物大分子的来源、分离技术及结晶条件的实用技术。

人们一般认为“蛋白的晶体生长是一门艺术而非科学”，这可追溯到早期的结构生物学，那时，在研究上着重于发展 X 射线技术而不是去理解结晶的过程，这可能是形成上述看法的原因之一。这影响了研究的进程，以致最近才有人致力于将蛋白晶体的生长变为一门科学（Feher and Kam 1985）。

生物大分子的晶体学研究有利于现代生物化学及分子生物学的建立。这些研究揭示了结构与功能的关系，是理解酶、核酸或它们与蛋白形成的复合物是怎样在生物体系内发生作用的基础。要想能运用这种强有力的方法，就必须有高质量的晶体（如应适合于结构分析及 X 射线晶体学研究），然而要获得高质量的晶体仍存在问题。

从物理学的观点来看，晶体是分子或分子集合有规则的三维阵列。理想的晶体可视为完美排列的无穷无尽的重复。晶体中的非对称单元（晶体的构件），以确定的三维方式精确地排列。然而实验所得的晶体是有限的且排列也不完全有序。

时至今日，小分子结晶在理论及实践上大都弄清楚了。在过去的十年中，人们努力将这些研究深入到生物大分子中，以合理应用这种方法进行生物大分子的结晶（Durbin and Feher 1990; Ihibault et al. 1992）。然而生物大分子的结晶过程仍经常是不能重复也不可预测的。实际上，非重复性及不可预测性同生物大分子组装的复杂程度似乎直接相关。

21.2 用于结晶的生物大分子

在结晶过程中，获得足够量的高纯生物大分子（通常为几毫克）是个关键问题，然而用于结晶的生物分子在野生型的细胞中其含量通常较少。在许多情况下，这个问题可采用基因工程得以解决。在细菌或真核生物中进行克隆及过量表达，从而使我们能够得到足够量的蛋白（Bugg 1986）。即使仔细考虑了所用的表达系统，但有些在大肠杆菌中表达的真核蛋白仍不能正确折叠，甚至更糟的是表达的蛋白可能不溶。某些情况下可通过蛋白突变，增加其溶解度来解决（Schulze et al. 1994）。

生物材料的来源

在过去的几年中，人们逐步意识到从极端型细菌中分离到的酶或核酸蛋白复合物与从中温型细菌及真核生物中分离到的同源物相比较，其稳定性较好。极端型细菌是指生长在极端的环境条件之下（如高温及高盐）的细菌，例如 Thermus thermophilus 其最佳生长温度为 75℃；一种嗜盐型的古细菌 Haloarcula marismortui 其细胞内钾离子浓度为 4mol/L。这些情况促使人们更加注意从极端细菌中获取结晶用的蛋白（迄今为止，取得了很好的结果）。因此生活在极端环境条件之下的 Bacillus stearothermophilus，Thermus thermophilus 及古细菌时常成了研究结构所用大分子的来源，从这些生物体中所获得的晶体其数量明显增多可说明这一点（据生物大分子晶体数据库报道，其网址为 http：//ibm4．carb．nist．gov：4400/bmcd/bmcd．html；也见于 Gilliland．et al．1994）。

21.3 生物大分子的纯化及处理

生物大分子的纯化、处理、稳定化及保存是结晶前的必要步骤。生物大分子的纯化方法因其性质和稳定性不同而差别很大。适宜的纯化方法主要与分子自身的性质有关。在多数情况下，纯化方案的改进及发展是通过不断的实验—失败—再实验而实现的。理想的，结晶前的纯化步骤不应超过 3～4 步层析步骤，因为在纯化过程中活性会部分丧失，从而使微弱的不均匀性增加，以致使结晶的倾向性降低（参见下文）。实验中还应小心避免蛋白酶或核酸酶的共分离（Lonber and Giegé 1992）。在层析过程中，应注意避开可能使蛋白不可逆地去折叠。作为一般规则，尿素及其他变性剂的步骤通常均应避免。结晶用的生物大分子其来源往往决定着纯化的方法。例如在大肠杆菌中表达过量的嗜热生物的蛋白，可以在 60～70℃加热 1 小时来使其同大肠杆菌中的其他蛋白分离开。在这种情形下，嗜热菌的蛋白仍保持在溶液中而大肠杆菌中的蛋白却倾向于聚集、沉淀（Desai and Pfaffle 1995）。

大分子结晶前的处理及保存必须小心进行以避免损伤或失活。因此这些大分子应保存于性质与其胞内环境相近的溶剂中。由此可见，对于每种大分子必须选择其最佳缓冲液（如 Hepes，其 pK 值受温度的影响很小）、pH、离子强度、还原剂（如 DTT，DTE，2-巯基乙醇等）。

一旦大分子已被纯化，我们应该注意到进行结晶研究所要求的纯度标准与通常的有所不同。当论及“结晶级”的纯度时，所研究的蛋白不仅要与无关的大分子、不需要的小分子分离，而且它们在构象上也应尽可能保持均一。换句话说，由于微小的不均一性是导致晶体的衍射能力降低的主要原因之一。因而要想得到高质量的生物大分子晶体，就应让结晶用的初始物不仅要纯而且还要是单一构象的均一群体（Lorber and Giegé 1992）。修饰反应（如磷酸化，乙酰化，甲基化等）往往使蛋白形成异构体，并影响其等电点。虽然传统的层析技术不能分离这些异构体，但可运用一种带有等电膜（其 pH 值可自定）的小盒子来分离这些异构体（Hoffer Pharmacia Biotech Inc），这种技术叫做 PrIME 技术，可构建 pH 差异仅为 0.01 的膜，运用这种方法已使表皮生长因子受体的异构体中得到的晶体质量大为改善。

21.4 结　　晶

如上所述，要想解析某一生物大分子的结构，其先决条件是得到高分辨率的晶体。然而生物大分子晶体很难生长，而且所得晶体一般很小，而且晶体易碎并对外界环境很敏感。

当进行生物大分子（蛋白质，核酸，核糖核酸蛋白复合体及病毒等）的结晶时，首先应形成一种在热力学上处于亚稳状态的过饱和溶液。一旦结晶过程开始，系统便向平衡方向移动。晶体的大小与过饱和的程度、核形成及生长的动力学途径有关（Arakawa and Timasheff 1985）。通常可以区分为三个不同的阶段：①形成稳定的晶核；②由晶核生长成晶体；③生长结束。我们必须注意到最适的成核条件与晶体生长条件并不一定相同。人们往往假定一旦微晶生成就应让其照旧生长下去。然而微晶一旦形成往往就意味着应该改变条件以更适合其生长（Mcpherson 1991）。

结晶方法

现有许多方法来获得生物大分子的晶体。最常见的方法是基于气相平衡或透析。最近有人尝试使结晶过程自动化（或至少用于筛选正确的条件），这些方法大都使用批量结晶法（Chayen et al. 1990），这需要一种商业化的结晶自动化仪（机器人）(Douglas Instruments，London，Great Britain)。

微量结晶法的原理是蒸气扩散，它最初用于 tRNA 的结晶，如今已是生物大分子结晶中使用最为广泛的方法。这些方法（悬滴法，座滴法，如图 21.1）的优点之一是只使用极微小量的液体（即极少量的蛋白）。在一个典型的试验中，液滴（约 5 ~ 10μl）含有要结晶的大分子物质、适当的缓冲液、结晶剂及其他添加剂，与池液处于平衡状态，池液体积往往是液滴的 100 倍。在池液中除不含有大分子物质外其他物质与液滴相同，通常含有两倍浓液的结晶剂。在达平衡的过程中，挥发性物质（水及有机溶剂）的扩散不断进行，直到液滴的蒸汽压与池液的相等为止。在该过程中发生的体积变化使结晶剂的浓度升高，这很有可能导致过饱和及随后的结晶。一般这些试验在 Limbro 盒中进行，

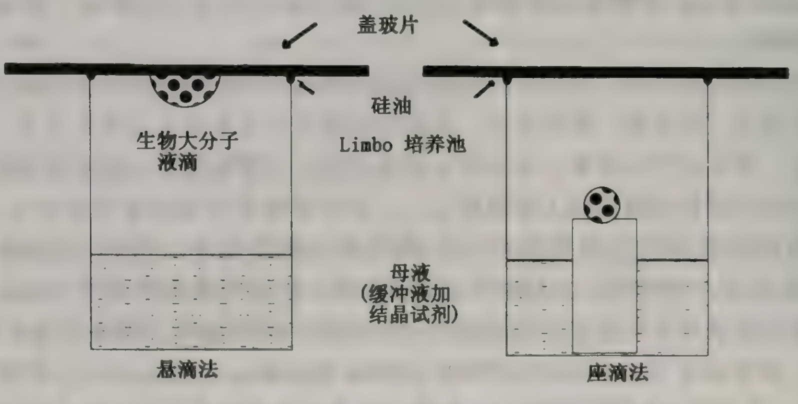


图 21.1　悬滴和座滴结晶方法。

在通常情况下这种塑料盒用于细胞培养。每一平板上共计有24个小池，每一小池的体积约为2ml。例如在悬滴法中蛋白液置于一盖玻片之上，小池边用硅胶涂好，然后将置有液滴的盖片翻转过来，将小池密闭好。在这种情况下，液滴“悬”于池液之上。一旦系统密闭完毕，平衡过程就开始了。

结晶剂

对任何结晶方法来说，尤其是生物分子的结晶，选用正确的结晶剂是关键性的步骤。从1557个（100%）已报道的生物分子晶体来说（Gilliland et al. 1994），最为常用的结晶剂为硫酸铵（占40%），接下来是聚乙二醇（PEG）（30%），磷酸盐占15%，有机溶剂（如2-甲基-2，4-戊二醇）占10%，小分子量的醇类占9%。在很多情况下，同时使用不止一种结晶剂。

在结晶过程中往往使用高浓度的结晶剂，因而在试验中应使用高纯度的商品化试剂，这一点是很重要的。另一方面这些物质也可通过某些成熟的技术进行再纯化，如：重结晶（适于硫酸铵及PEG）；柱层析；蒸馏或层析（适于2-甲基-2，4-戊二醇情况下）（Lorber and Giegé 1992）。

影响结晶的因素

影响大分子晶体形成的一些因素包括：pH值、温度、离子强度、大分子物质及沉淀剂的浓度。其他一些因素也有影响，这其中包括：纯度、添加剂、大分子物质的来源、细菌及真菌所引起的污染程度、大气压、金属离子、振动情况、样品体积、氧化-还原环境、电磁场、研究者的处理方法、灰尘的出现及去污剂（Giegé and Ducruix 1992）。当然在实际中不可能对所有这些不同的因素加以调控，也不可能在研究某一未结晶过的大分子时逐一检测每一个因素，实际运用中是多因素的，即许多条件同时进行检验。

结晶的策略

“正确”的组合各因素方可获得晶体，特别是对一种新的大分子要想找到一种先验性的结晶方法是极为困难的。使用不完全组合设计的结晶试验可作为寻找晶体生长条件的方法之一。采用因子设计，对于通过较少的试验来进行较大规模的条件筛选是很重要的。从这些试验中人们还可以了解到诸多因素中的主要因素及它们之间的相互关系（Carter 1992）。另一种获得新大分子晶体的常用方法是用Jancarik及Kim（1991）提出的“稀疏矩阵”进行筛选。这种方法使用了一系列结晶试剂，共计48种条件。尽管这个矩阵不是不完全组合方法，然而它可以反映出使用不同结晶剂的分布情况来。也即是说，这个矩阵偏向于已知的大分子结晶条件，是从中筛选出来的。在进行结晶条件的初次筛选时，这48种条件的溶液可以买到（Hampton Research，Inc）。我们必须注意到这并不能保证获得晶体。尽管如此，如果没有获得晶体，所得到的溶解情况也是有用的。我们可以在得到沉淀的条件附近进行调整来进行再筛选。

寻找衍生物

一旦生成衍射良好的晶体，获得它的相位信息又成为了下一个关键问题。在获得相

位信息的方法中，现在使用最为广泛的是同晶置换法，即让大分子与重原子形成共晶（或浸泡晶体）。进行结构研究时，将重原子导入晶体中并使其与原来未被修饰的“天然”晶体保持晶型一致是其先决条件。“衍生物”晶体的生长条件与天然晶体的生长条件可能有很大差别。在用重原子溶液浸泡晶体时，必须找到适于浸泡过程及处理浸泡后晶体的条件。

21.5 与结晶相关的数据收集方面的进展

收集数据时运用冷冻技术是减少研究结构所需材料方面所取得的重大进展。这种方法极大地降低了晶体的辐射损伤。这样从一个晶体中便可收集到一整套数据（Hope et al. 1989）。另一经常遇到的问题是晶体的大小还不足以进行结构分析。现在运用高强度的同步辐射已至少部分解决了这个问题。可有效的照射小至50μm 的晶体（Lattmann 1994）。

21.6 大分子装配体的结晶

研究较大的生物大分子晶体非常困难，尤其是那些晶胞非常大的晶体。由于这些装配体中有大量的原子存在，在衍射面上有更多的反射波需要测量，而且它们分布得很近。第一个通过晶体学解析的巨大的大分子结构是二十面体病毒（icosahedral viruses）。然而，在该情况下，病毒的高对称性减轻了上述的某些困难（Lattmann 1994）。另一极具挑战性的已结晶的结构是细菌的核糖体。一个典型的细菌核糖体分子量约为 230 万，含有近 60 种不同的蛋白和三种长度及组分不同的 RNA 链。不巧的是细菌的核糖体不具有任何内部的对称性。尽管如此，现已获得了整个核糖体（70S）及两个亚基的（30S，50S）的晶体。Haloarcula marismortui 的 50S 亚基已获得了近原子级的衍射图（2.9Å）（Berkovitch-Yellin et al. 1992；Franceschi et al. 1993）。最近在获得中等分辨率的结构方面已取得重大进展，采用将核糖体晶体浸于含有不同钨簇溶液中的方法，现已获得中等分辨率的初步电子云密度图（Franceschi et al. 1995）。

（郭　青译　饶子和校）

供应厂商

Hampton Research 25431 Cabot Road, Suit 205 Laguna Hills CA 92653-5527 USA. Fax 1-714-6991040 Tel. 1-714 586 1453. E-mail: XTALROX@AOL:COM. Crystallization screening kits and most of the materials needed for crystallization

Hoefer Pharmacia Biotech Inc. 654 Minnesota Street. P.O. Box 77387 San Francisco, California 94107-3807. Tel 1-415-282 2307, Fax 1-415-821-1081. PrIME system for separation of protein isoforms

Flow Laboratories Inc. Mc Lean Virginia 22102 U.S.A Limbro plates

参考文献

Arakawa T, Timasheff SN (1985) Theory of protein solubility. Methods in Enzymol 114: 49

Berkovitch-Yellin Z, Bennet WS, Yonath A (1992) Aspects in structural studies on ribosomes. CRC Rev Biochem Mol Biol 27:403

Bugg CE (1986) The future of protein crystal growth. J Cryst Growth 76:535

Carter CW Jr.(1992) Design of crystallization experiments and protocols. In: Ducruix, A and Giegé, R (eds) Crystallization of nucleic acids and proteins: a practical approach. Oxford Univ., p 47,

Chayen N, Stewart P, Maeder D, Blow D (1990) An automated system for micro-batch protein crystallization and screening. J Appl Cryst 23:297–302

Desai UJ, Pfaffle PK (1995) Single-step purification of a thermostable DNA polymerase expressed in Escherichia coli. Biotechniques 19: 780–784

Durbin SD, Feher G (1990) Studies of crystal growth mechanisms of proteins by electron microscopy. J Mol Biol 212:763

Feher G, Kam Z (1985) Nucleation and growth of protein crystals: general principles and assays. Methods in Enzymol 114: 77

Franceschi F, Weinstein S, Evers U, et al. (1993) .Towards atomic resolution of prokaryotic ribosomes: crystallographic, genetic and biochemical studies. In: K. Nierhaus et al. (eds) The translational apparatus, Plenum, NY, p 397

Franceschi F, Weinstein S, Sagi I, et al. (1995) The combination of functional, genetic, microscopical and crystallographical studies led to initial phasing of data collected from ribosomal crystals at intermediate resolution. In: Sarma R, Sarma M (eds) Biological structure and dynamics, vol 2. Adenine, New York

Giegé R, Ducruix A (1992) An introduction to the crystallogenesis of biological macromolecules. In: Ducruix A, Giegé R (eds) Crystallization of nucleic acids and proteins: a practical approach. Oxford Univ., p 7

Gilliland GL, Tung, M, Blakeslee, D.M, Ladner J (1994). The biological macromolecule crystallization database, version 3.0: new features, data, and the nasa archive for protein crystal growth data. Acta Crystallogr D50: 408

Hope H, Frolow F, von Böhlen K, Makowski I, Kratky C, Halfon Y, Danz H, Webster P, Bartels K, Wittmann HG, Yonath A (1989) Cryocrystallography of ribosomal particles. Acta Crys. B45: 190

Ihibault I, Langowski J, Lebermann R (1992) Optimizing protein crystallization by aggregate size distribution analysis under dynamic light scattering. J Cryst Growth 122: 50

Jancarik J, Kim SH (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. J Appl Cryst 24:409–411

Lattman E E (1994) Protein crystallography for all. Proteins: 18:103

Lorber B, Giegé E. (1992) Preparation and handling of biological macromolecules for crystallization. In: Ducruix A, Giegé R (eds) Crystallization of nucleic acids and proteins: a practical approach. Oxford Univ., p. 19

McPherson A (1991) Useful principles for the crystallization of proteins. In: H Michel (ed) Crystallization of membrane proteins. CRC, Boca Raton, p 1

Schulze AJ, Degryse E, Speck D, Huber R, Bischoff R (1994) Expression of alpha 1-proteinase inhibitor in Escherichia coli: effects of single amino acid substitutions in the active site loop on aggregate formation. J Biotechnol 32: 231

Weber W, Wenisch E, Guenther N, Marnitz U, Betzel C, Righetti PG (1994) Protein microheterogeneity and crystal habits: The case of epidermal growth factor receptor isoforms as isolated in a multicompartment electrolyzer with isoelectric membranes. J Chromatog 679:181

读者反馈表

亲爱的读者：

首先感谢您购买我们的出版物。读者的需要就是我们的目标，我们希望与您建立起密切的联系。请将下表填好后寄回（或用 e-mail 发回），以便我们改进工作。我们会记下您的名字，定期为您提供图书信息。谢谢！

科学出版社 科学出版中心 生命科学组

北京东黄城根北街 16 号（100717） E-mail:spbio@163.net http://spbio.yeah.net

（此表可复印或录入计算机后使用）

<table>
<tr><td>姓名</td><td></td><td>性别</td><td></td><td>生日</td><td colspan="2">年 月 日</td></tr>
<tr><td>单位</td><td colspan="4"></td><td>职务/职称</td><td></td></tr>
<tr><td>地址</td><td colspan="6"></td></tr>
<tr><td>E-mail</td><td></td><td>电话</td><td></td><td>传真</td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td colspan="7">你在何处购买的此书?</td></tr>
<tr><td colspan="7">你对本书的总体评价（学术水准、文笔及翻译水平、印制质量等）。</td></tr>
<tr><td colspan="7">你在书中发现的错误（请指出页码、错漏内容及改正方案等，可以另附纸）。
1.
2.
3.
4.</td></tr>
<tr><td colspan="7">你还需要哪方面的书?</td></tr>
<tr><td colspan="7">你还有什么别的建议和意见?</td></tr>
</table>

（书名：《蛋白质结构分析：制备、鉴定与微量测序》）

收到期 2005年4月27日
来　源 科学出版社
书　价 40.00元
单据号 20436725
开票日期 2005年4月28日

中科院植物所图书馆
S0003873

全国高技术重点图书·生物技术领域

结构生物学是生命科学领域又一个新的研究热点，飞速发展的蛋白质结构分析技术是研究蛋白质功能的基础。随着蛋白质组时代的来临，许多基因组分析留下的悬而未决的问题，可能通过直接的蛋白质的技术而得到解决。本书涉及了这个领域最新、最灵敏的方法。这些方法和技术已经被广泛应用于当今从事制药、生物医药和蛋白质测序的生化和生物工程实验室。

译者介绍

施蕴渝 分子生物物理学家，中国科学院院士，中国科学技术大学生命科学院院长。施蕴渝教授领导中国科大结构生物学开放实验室，深入开展了与蛋白质分子设计及药物设计有关的基础理论和方法学研究。他们在酶与底物、药物与靶分子结合自由能计算、蛋白质稳定性的计算机模拟、蛋白质分子的随机动力学模拟、蛋白质静电相互作用研究以及酶作用机制的计算机模拟方面取得了创造性的研究成果，为这些理论和方法的发展做出了贡献，并引起了国际同行的关注。

饶子和 国家科技部“973”基础前沿项目“蛋白质功能、三维结构和折叠原理的研究”首席科学家，清华大学生命科学与工程学院生物物理与结构生物学研究所所长。饶子和教授测定了艾滋病毒基质抗原的晶体结构，在世界上“首次揭示了艾滋病毒分子的装配模型，为艾滋病毒药物研究提供了一个新的途径”（Nature 编者按）。他创建的清华大学结构生物学实验室拥有完备的设施和一流的科研骨干，目前主要从事与人类重大疾病相关的蛋白质及其复合物、组装体的三维结构与功能的研究。

陈常庆 中国科学院上海生物工程研究中心资深研究员，是我国曾经两次获得国家自然科学一等奖的重大理论研究成果——人工合成胰岛素和酵母丙氨酸转运核糖核酸的主要研究成员。陈常庆教授主持着蛋白质功能和蛋白质工程实验室的研究工作，主要研究方向是以基因工程和蛋白质工程技术为基础的蛋白质、活性多肽及其相关产品的应用研究。

(Q-0896.1102)

责任编辑：丁海珈　姚坚毅

封面设计：卢秋红

ISBN 7-03-007648-6

9 787030 076489 >

ISBN 7-03-007648-6/Q·896

定　价：40.00 元